



Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

PRESIDENTE: *Ch.ma Prof.ssa Chilin Adriana*

TESI DI LAUREA

EFFETTI DELL'UROLITINA A SULLA FUNZIONALITÀ MUSCOLARE

RELATORE:

Prof.ssa Mammucari Cristina

LAUREANDA: Tegen Gloria

Anno Accademico 2022-2023

INDICE

OBIETTIVO DELLA TESI	1
CAPITOLO 1: IL MUSCOLO SCHELETRICO	2
CAPITOLO 2: I MITOCONDRI	5
2.1 LA BIOGENESI.....	7
2.2 LA MITOFAGIA	9
2.3 IL CATABOLISMO LIPIDICO	13
2.4 LA SARCOPENIA.....	16
CAPITOLO 3: L'UROLITINA.....	20
3.1 GLI ELLAGITANNINI	20
3.2 L'INTERINDIVIDUALITÀ.....	25
CAPITOLO 4: GLI STUDI SULL'UROLITINA.....	27
4.1 LA SICUREZZA DEL PROFILO TOSSICOLOGICO.....	27
4.2. GLI STUDI PRECLINICI SUL MODELLO ANIMALE	29
4.3 GLI STUDI IN UMANO	48
CAPITOLO 5: CONCLUSIONE.....	64
Bibliografia.....	65

OBIETTIVO DELLA TESI

L'obiettivo di questa tesi è di riportare criticamente uno studio di ricerca bibliografica riguardo all'Urolitina A, un composto metabolico derivato degli ellagitannini con effetti positivi sulla funzione mitocondriale del muscolo scheletrico.

CAPITOLO 1: IL MUSCOLO SCHELETRICO

Il muscolo scheletrico costituisce il 40% del peso corporeo totale di un individuo ed è composto per il 75% di acqua, 20% di proteine e 5% di altre sostanze tra cui carboidrati, grassi, sali inorganici e minerali. Le proteine che costituiscono il tessuto muscolare rappresentano il 50-75% delle proteine totali dell'organismo e impattano per un 35-50% sul ricambio proteico dell'intero corpo (Frontera & Ochala, 2015).

Ogni muscolo è costituito dall'unione di fasci di fibre, a loro volta formate da fasci di miofibrille. Il numero di fibre di un muscolo è determinato dai processi di miogenesi embrionale e post-natale. Inoltre, il numero di miofibrille può cambiare drasticamente, andando incontro ad un aumento, come avviene a seguito dell'allenamento, o ad una diminuzione con conseguente atrofia muscolare.

Le fibre hanno un diametro compreso tra i 10 e i 100 micron, lunghezza variabile da pochi millimetri a 50 centimetri e si presentano come unità multinucleate. Sono circondate da tessuto connettivo che alle estremità si lega ai tendini, tramite i quali il muscolo s'inserisce nell'osso. Ciascuna fibra è costituita longitudinalmente da miofibrille composte principalmente da due miofilamenti, actina (filamento sottile) e miosina (filamento spesso), responsabili della contrazione muscolare. Quando il muscolo è a riposo i due filamenti risultano saldamente legati. Al contrario, durante la contrazione muscolare, la loro disposizione consente loro di scorrere l'una sull'altra per permettere la contrazione del muscolo. Le cellule muscolari per contrarsi hanno bisogno di energia che riescono ad ottenere grazie ai mitocondri che producono l'ATP necessario ad eseguire contrazioni muscolari ripetute. L'ATP è una molecola costituita da adenina (base azotata), ribosio (zucchero pentoso) e un complesso di radicali fosforici. A differenza dei legami chimici medi, i legami fosforici risultano ricchi di energia poiché arrivano ad una quantità energetica di 8000 calorie. L'ATP, durante la contrazione, si lega alla miosina provocando la rottura del legame tra i due miofilamenti, provocandone dunque la separazione.

Successivamente l'ATP viene idrolizzato ad ADP e fosfato e la miosina si lega ad un'altra subunità di actina prossimale. Lo spostamento della miosina permette lo scorrimento dei filamenti e quindi la contrazione (David L. Nelson & Michael M. Cox, 2015) (Frontera & Ochala, 2015)(Guyton Arthur C. & Midrio M., 2001).

Tramite questo processo il muscolo scheletrico converte l'energia chimica in energia meccanica utile per il movimento, il mantenimento della postura e la produzione di forza e potenza. La durata della contrazione muscolare varierà a seconda del tipo di fibra:

- TIPO 1: a contrazione lenta, la durata della contrazione è uguale o superiore a 100 ms;
- TIPO 2: a contrazione rapida, divisa a sua volta nei sottotipi 2A, 2X, e 2B (nell'uomo non è presente 2B). La durata della contrazione è di qualche decina di ms (Talbot & Maves, 2016).

Queste tipologie di fibre generalmente sono compresenti all'interno di un singolo gruppo muscolare e hanno la capacità di rimodellare il fenotipo muscolare permettendo l'adattamento a diverse condizioni. La specificità del tipo di fibra inizia durante lo sviluppo embrionale, ancora prima dell'input neurale, mentre dopo la nascita l'influenza neurale può indurre il passaggio di alcune fibre muscolari da un fenotipo di tipo lento ad uno rapido e viceversa (Talbot & Maves, 2016).

Il percorso energetico metabolico utilizzato per le varie attività fisiche quali ad esempio una corsa, una camminata o semplici azioni di vita quotidiana dipende dalla durata e dall'intensità dell'attività svolta. Si individuano 3 tipologie di dispendio energetico:

- Anaerobica lattacida che sfrutta i depositi di ATP e creatina fosfato (CP). È caratteristica delle attività a breve durata e ad alta intensità. Le riserve di ATP e CP nelle fibre muscolari sono limitate e tendono ad esaurirsi rapidamente;
- Anaerobica lattacida tramite glicolisi anaerobica che produce rapidamente ATP per dare inizio ad azioni muscolari brevi (un paio di minuti). I prodotti finali di questa via producono però acido lattico che, abbassando il pH, può compromettere la funzionalità muscolare dando affaticamento. Per questa via vengono utilizzate principalmente le fibre rapide di tipo 2;
- Aerobica tramite fosforilazione ossidativa. Viene principalmente impiegata in casi di attività di durata maggiore (da minuti ad ore). Per questa via vengono utilizzate principalmente le fibre lente di tipo 1

(Frontera & Ochala, 2015) (Guyton Arthur C. & Midrio M., 2001) (Alessandro Rubini, 2010)

Da un punto di vista metabolico il muscolo funge da deposito di substrati utilizzati poi durante l'attività fisica. I carboidrati (glucosio plasmatico e glicogeno muscolare) e i grassi (acidi grassi

liberi plasmatici e trigliceridi muscolari) sono i due principali combustibili utilizzati dalla cellula muscolare per produrre ATP (Frontera & Ochala, 2015).

Durante la contrazione muscolare viene consumato ossigeno. Il consumo di ossigeno richiede un certo tempo per essere attivato e, a seconda del soggetto, arriva ad un valore soglia definito consumo massimo di ossigeno ($VO_2 \max$). $VO_2 \max$ varia a causa dell'intensità e della durata dello sforzo:

- A bassa/moderata intensità $VO_2 \max < 70\%$, i lipidi fungono da maggior fonte energetica. Il metabolismo muscolare è dunque aerobico e non vi è produzione di lattato.
- Ad alta intensità $VO_2 \max > 75\%$, i carboidrati fungono da maggior fonte energetica. A mano a mano che aumenta l'intensità si ha un aumento graduale del glucosio che prevale sugli acidi grassi (Gnoni et al, 2020).

Le fibre di tipo 1 e 2A utilizzano principalmente il metabolismo ossidativo, mentre le fibre 2X e 2B utilizzano principalmente il metabolismo glicolitico (Talbot & Maves, 2016).

La capacità di generare ATP nel muscolo è data dalla concentrazione e dall'attività degli enzimi del metabolismo ossidativo a livello delle fibre. In particolare, le fibre di TIPO 1, caratterizzate da piccole dimensioni e bassa velocità di accorciamento, contengono molti più mitocondri delle fibre di TIPO 2 e questo aumento si traduce in un'elevata capacità di sintetizzare ATP (Webb, 2003).

Il metabolismo mitocondriale è quindi un'importante fonte energetica per il muscolo. L'allenamento di resistenza è il principale mezzo utilizzato per ottenere un adattamento mitocondriale in quanto, aumentando le proteine mitocondriali totali, migliora la capacità di fornire energia al muscolo in esercizio. Con un allenamento prolungato il volume mitocondriale aumenta fino al 40-50% (Memme et al, 2021).

CAPITOLO 2: I MITOCONDRI

I mitocondri sono organelli cellulari citoplasmatici di origine batterica con una notevole plasticità che, grazie al loro genoma, riescono a replicarsi autonomamente. Sono costituiti da due membrane fosfolipidiche, una esterna e una interna.

La membrana mitocondriale esterna permette il passaggio solo a piccole molecole e ioni di dimensioni non superiori a 500 Da tramite le porine che fungono da canali acquosi.

La membrana mitocondriale interna è selettivamente permeabile, non contiene porine ed è ricca di cardiolipina, una proteina che rende la membrana impermeabile. Gli ioni e le molecole possono attraversare la membrana per entrare o uscire dalla matrice mitocondriale solo grazie ai vari trasportatori. Contiene inoltre molti polipeptidi, tra cui un elevato contenuto proteico per i complessi di fosforilazione ossidativa.

La matrice mitocondriale rappresenta lo spazio circoscritto dalla membrana interna. Al suo interno sono contenuti gli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici e sono contenute anche molecole di DNA circolare a doppio filamento definito DNA mitocondriale (mtDNA). Il mitocondrio infatti può svolgere una propria sintesi proteica (David L. Nelson & Michael M. Cox, 2015).

I mitocondri svolgono molte funzioni vitali per l'organismo:

- Produzione di calore;
- Deposito di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} ;
- Sintesi di proteine;
- Sintesi del gruppo Eme;
- Beta ossidazione degli acidi grassi;
- Induzione di apoptosi;
- Produzione di energia sotto forma di ATP.

La fosforilazione ossidativa è il processo biochimico mediante il quale si genera l'ATP utile per soddisfare le varie richieste metaboliche della cellula.

Essa avviene nei mitocondri ed è costituita dalla catena di trasporto degli elettroni (ETC) organizzati in complessi multienzimatici intramembrana:

- Complesso I - NADH deidrogenasi: enzima di grandi dimensioni ubicato tra membrana interna e matrice mitocondriale. Contiene 43 subunità di cui 7 codificate da DNA mitocondriale (mtDNA) ossia ND1- ND6 e ND4L, e le restanti da DNA nucleare;
- Complesso II - succinato deidrogenasi: contenente 4 subunità tutte codificate da DNA nucleare;
- Complesso III - citocromo bc1: contiene 11 subunità di cui 10 codificate da DNA nucleare e 1 subunità codificata da DNA mitocondriale, ossia il citocromo c;
- Complesso IV - citocromo c ossidasi: contiene 13 subunità di cui 3 codificate da mtDNA, ossia COXI, COXII e COXIII.

Questi 4 complessi compongono la catena di trasporto degli elettroni.

NADH e FADH₂, prodotti tramite reazioni di ossido-riduzione, forniscono gli equivalenti riducenti per il trasporto degli elettroni attraverso la catena mitocondriale, generando un gradiente elettrochimico tra i due lati della membrana mitocondriale interna.

Il NADH tramite il Complesso I e il FADH₂ tramite il Complesso II rilasciano entrambi 2 elettroni che verranno poi trasportati nei complessi successivi. Come evento finale, l'ossigeno molecolare viene ridotto ad acqua. Il passaggio degli elettroni determina la fuoriuscita di ioni H⁺ dalla matrice e la formazione del gradiente elettrochimico necessario per l'attività della ATP sintasi.

La formazione di ATP avviene grazie ad un ulteriore complesso chiamato ATP sintasi (Complesso V). Tale complesso è costituito dalle componenti F₀ e F₁, il DNA mitocondriale codifica per 2 subunità ossia ATP6 e ATP8.

L'ATP sintasi sfrutta l'energia del gradiente elettrochimico per sintetizzare ATP a partire da ADP e P (David L. Nelson & Michael M. Cox, 2015)(Figueiredo et al, 2008) (Yan et al, 2019).

2.1 LA BIOGENESI

La biogenesi mitocondriale è un processo di sintesi mitocondriale in modo tale da assicurare il rinnovamento mitocondriale per permettere un miglior funzionamento cellulare (Popov, 2020). Le variazioni dettate dalla biogenesi consistono non solo in cambiamenti numerici, ma anche di dimensioni e di massa mitocondriale (Jornayvaz & Shulman, 2010). Il numero dei mitocondri infatti varia per moltissime ragioni tra cui il diverso fabbisogno energetico delle cellule lo stadio del ciclo cellulare, l'ambiente, l'equilibrio redox della cellula, lo stadio di differenziazione e una serie di meccanismi di segnalazione cellulare (Malik & Czajka, 2013).

I singoli mitocondri possono contenere diverse copie del genoma mitocondriale che viene ereditato dalla linea germinale femminile materna. Il mtDNA paterno invece viene degradato durante la fecondazione. Nelle cellule proliferative il genoma mitocondriale viene replicato, separato e distribuito equamente tra le cellule figlie e ogni individuo avrà quindi lo stesso genoma in tutti i tipi di cellule (Malik & Czajka, 2013)(Duchen, 2004).

Il mtDNA non possiede regioni introniche come il DNA nucleare e conserva 37 geni disposti in modo compatto. Di questi 37 geni vi sono 13 proteine indispensabili per la fosforilazione ossidativa e 24 geni, 22 tRNA e 2 rRNA, che codificano il meccanismo traduzionale del genoma mitocondriale stesso. Grazie ad esperimenti di centrifugazione in gradiente alcalino è stato possibile separare i doppi filamenti di mtDNA identificando un filamento spesso (filamento H) e un filamento leggero (filamento L). Il filamento H codifica per 12 polipeptidi coinvolti nelle subunità del Complesso I (ND1 - ND5 e ND4L), Complesso III (citocromo b), Complesso IV (COX1 - COX III), Complesso V (ATP6 e ATP8), 2rRNA e 14tRNA. Il filamento L codifica un solo polipeptide ND6 e 8tRNA. Inoltre vi è anche una regione non codificante di poche sequenze definita D-loop (Diaz & Moraes, 2008) (Yoon et al, 2010).

Il mtDNA, in combinazione con il DNA nucleare, è quindi responsabile dell'espressione delle proteine mitocondriali (Memme et al, 2021).

All'interno della matrice mitocondriale il sistema genetico possiede numerosi fattori per il mantenimento, la regolazione del genoma, l'espressione genica e ribosomi mitocondriali per la traduzione. Questi organelli non sono entità autosufficienti nella cellula e usano un sistema genetico mitocondriale con un meccanismo di decodifica semplificato.

Le 13 proteine codificate dal mtDNA nell'uomo sono altamente idrofobiche e formano parti centrali dei complessi di fosforilazione ossidativa della membrana interna mitocondriale.

Sebbene un piccolo insieme di proteine venga codificato nel genoma mitocondriale, circa il 99% viene codificato da geni nucleari.

La replicazione e la trascrizione dipendono da fattori codificati dal nucleo e la maggior parte degli enzimi delle varie vie cataboliche situate nei mitocondri sono codificate da DNA nucleare (Taanman, 1998) (Pfanner et al, 2019).

La biogenesi mitocondriale coinvolge il coordinamento sia del genoma nucleare che del genoma mitocondriale e si compone di 2 step:

- Trascrizione e traduzione del mtDNA, attivata dalla famiglia delle PGC-1a;
- Sintesi, importazione e assemblaggio delle proteine mitocondriali codificate dal DNA nucleare (Popov, 2020).

Il processo agisce tramite la via PGC-1a - NRF1/NRF2 - TFAM. PGC-1a risulta il principale regolatore della biogenesi poiché può agire con molti fattori di trascrizione e dalla sua deacetilazione attiva a sua volta anche i fattori di respirazione nucleare NRF1/NRF2 e il fattore di trascrizione mitocondriale TFAM. PGC-1a promuove anche la funzione mitocondriale in quanto induce l'espressione delle subunità della fosforilazione ossidativa. PGC-1a viene attivato da vari stimoli interconnessi tra loro quali ad esempio NAD^+ /Sirt1 che deacetila PGC-1a e l'aumentato livello di Ca^{2+} che attiva indirettamente l'espressione di PGC-1a andando a stimolare la protein-chinasi calcio/calmodulina dipendente CaMK. Anche i livelli aumentati di adenosin-fosfato AMP possono attivare la biogenesi mitocondriale in quanto agiscono tramite l'attivazione dell'enzima adenosin-fosfato protein-chinasi AMPK che fosforila PGC-1a, oppure tramite la conversione di AMP in adenosin-fosfato ciclico (cAMP) che attraverso l'adenilato ciclasi (AC) porta sempre ad un aumento di PGC-1a (Cardanho-Ramos & Morais, 2021).

Esistono quindi una varietà di segnali ambientali e cellulari che attivano nel mitocondrio sistemi di adattamento, modifica, espansione e rimozione di parti in modo tali da preservarne la vita e la funzione cellulare (Quadrilatero, 2023).

Tutto ciò implica una comunicazione costante tra nucleo e mitocondri (Cardanho-Ramos & Morais, 2021). Esistono infatti vari percorsi di importazione della proteina in base alla funzione

che questa dovrà ricoprire, per cui verrà distribuita sullo spazio mitocondriale esterno, sulle due membrane interna ed esterna, nello spazio intermembrana o nella matrice interna (Diaz & Moraes, 2008).

Il rimodellamento, attraverso la promozione di geni mitocondriali e la crescita della rete mitocondriale, migliora l'efficienza e la capacità aerobica per la fornitura di ATP (Quadrilatero, 2023). L'induzione della biogenesi mitocondriale è uno dei principali adattamenti del muscolo scheletrico che, tramite l'aumento della funzione mitocondriale, induce un rimodellamento del tessuto (Quadrilatero, 2023). I muscoli coinvolti in un'attività fisica regolare e prolungata possono aumentare la loro attività e il loro contenuto mitocondriale. Ne consegue che muscoli che lavorano più frequentemente, avranno una maggior attività e contenuto mitocondriale derivante da una più elevata attivazione della biogenesi mitocondriale (Jornayvaz & Shulman, 2010). L'allenamento di resistenza e l'allenamento ad alta intensità stimolano maggiormente il rimodellamento mitocondriale aumentando sia il numero che le dimensioni dei mitocondri. Il rimodellamento mitocondriale facilita i miglioramenti del VO_2 max indotti dall'esercizio andando ad aumentare di circa il 20% le proteine cellulari (Cobley et al, 2015).

Tra i vari tipi di fibre muscolari umane, il contenuto mitocondriale risulta più elevato nelle fibre di tipo I, seguite dalle fibre di tipo IIa e IIx. In tutte e tre le tipologie di fibra è stato dimostrato che, dopo 6 settimane di esercizio, vi è un aumento dell'espressione di PGC-1 α , il principale regolatore della biogenesi mitocondriale (Qaisar et al, 2016)

2.2 LA MITOFAGIA

L'autofagia è una via catabolica evolutivamente conservata che mantiene l'omeostasi cellulare grazie alla rimozione di contenuti citoplasmatici, proteine, aggregati proteici a lunga emivita ed organelli in risposta ad una varietà di stimoli cellulari. Sebbene l'autofagia sia generalmente riconosciuta come un processo di degradazione non selettivo, essa agisce anche in maniera selettiva per mediare la clearance di particolari organelli. A livello mitocondriale, l'intera eliminazione è compiuta da una forma selettiva di autofagia definita mitofagia.

La mitofagia aiuta a mantenere il controllo della qualità e della quantità mitocondriale in più tipologie di cellule grazie al riconoscimento dei mitocondri danneggiati o non necessari e alla loro efficiente rimozione (Pickles et al, 2018) (Onishi et al, 2021). Il processo coinvolge molte proteine e complessi proteici e si articola in più fasi. Una volta riconosciuto il mitocondrio danneggiato esso viene fagocitato da un fagoforo a doppia membrana. Il fagoforo può provenire dalla membrana plasmatica, dal reticolo endoplasmatico, dal Complesso di Golgi, dal nucleo o dal mitocondrio stesso e la sua forma sferica è destinata ad allungarsi in modo tale da inghiottire e sigillare i mitocondri al suo interno. La struttura che consegue alla fagocitosi viene chiamata autofagosoma mitocondriale o mitofagosoma che a sua volta andrà in contro a fusione con un lisosoma formando un autolisosoma. L'autolisosoma porta alla degradazione del mitocondrio danneggiato che viene poi riciclato dalla cellula (*figura 1*).

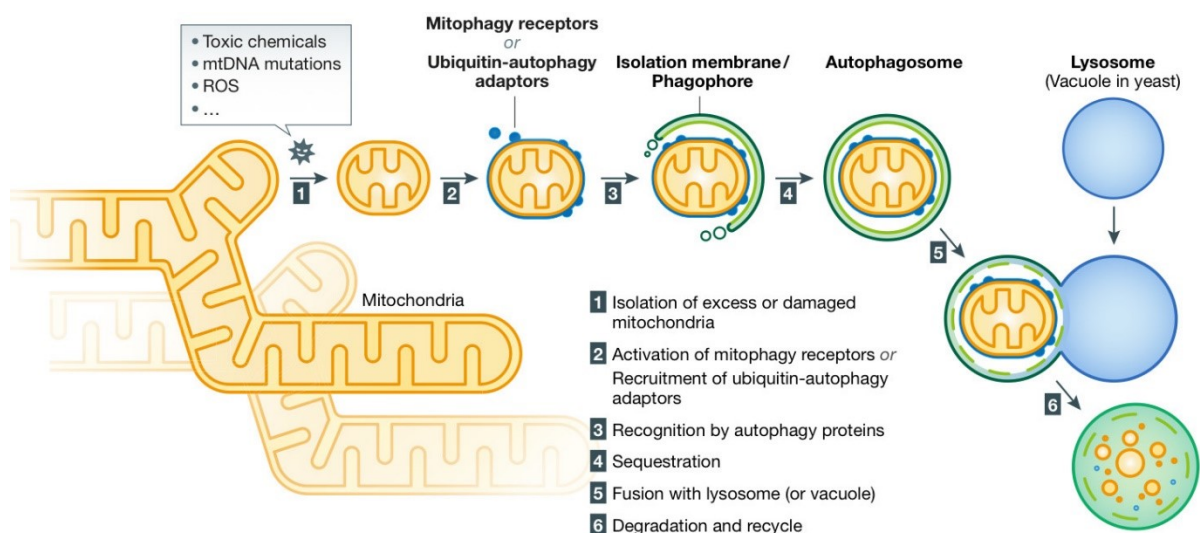


Figura 1: Rappresentazione del processo mitofagico dato dall'isolamento e al riconoscimento dei mitocondri danneggiati o in eccesso i quali vengono fagocitati con formazione dell'autofagosoma che, fondendo con il lisosoma porta alla loro degradazione e riciclo (Onishi et al., 2021, figura 1)

Molti degli stessi fattori regolatori dell'autofagia, in particolare nella macro-autofagia, vengono coinvolti anche nella mitofagia. La fase di iniziazione comincia, come per l'autofagia, dalla fosforilazione di unc-51 da parte di AMPK che attiva il complesso di ULK1. ULK1 recluta e si

unisce a sua volta a due complessi per regolare la formazione della membrana che porta alla creazione del fagoforo:

- Complesso di nucleazione PI3K III (costituito da PI3KIII, vps34, vps15, Beclin-1, BCL2, AMBRA1);
- Complesso di legame PI3P (ATG2A/B, wip12, ATG9A).

Si ha poi l'attivazione di 2 sistemi di coniugazione che portano a maturazione e allungamento dell'autofosoma:

- Sistema di coniugazione ATG12 (costituito da ATG12 ATG5 e ATG7);
- Sistema di coniugazione LC3-I (costituito da LC3-I e ATG4).

I mitocondri danneggiati vengono riconosciuti tramite 2 complessi proteici:

- LC3-II (costituito da LC3-II, ATG7 e ATG5);
- chinasi 1 indotta da PTEN PINK1/PARKIN1.

I mitocondri individuati vengono poi degradati per azione dei lisosomi che si fondono con la membrana formando il lisosoma. Ciò è possibile sempre grazie alla protein-chinasi ULK1 che porta alla fusione autolisosomiale. Infine l'ultimo passaggio è caratterizzato dalla biogenesi dei lisosomi tramite il complesso formato da AMPK, LAMP1 e LAMP2, grazie al quale segue poi la degradazione delle proteine ad amminoacidi (*figura 2*) (Drake & Yan, 2017).

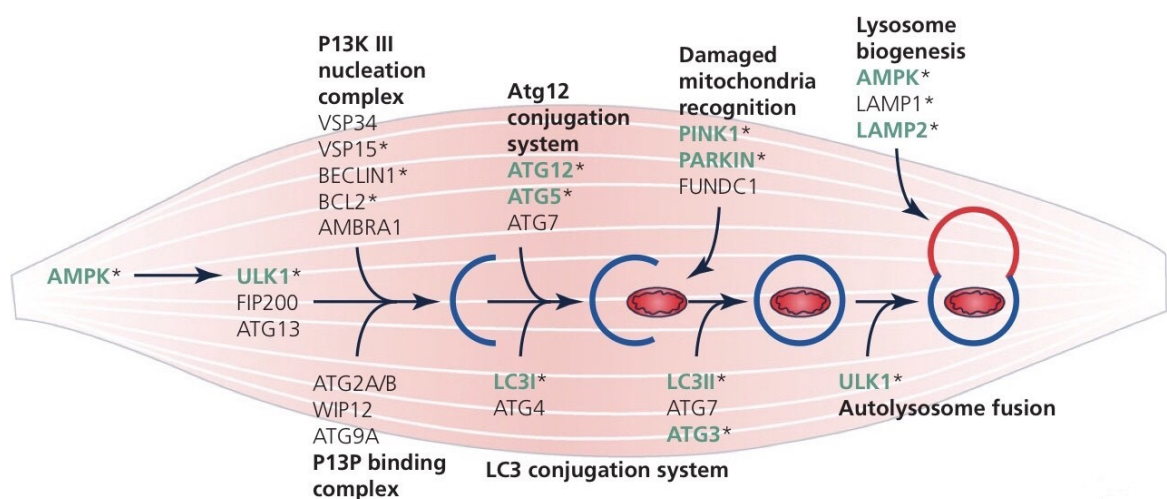


Figura 2: *Proteine coinvolte durante il processo mitofagico nel muscolo scheletrico (Drake & Yan, 2017, figura 2)*

Alcune proteine mitofagiche vengono utilizzate anche nei processi di apoptosi stimolati dalla via intrinseca mitocondriale che integra i segnali generati da fattori di stress provocando una morte programmata. La famiglia di regolazione della morte cellulare Bcl-2 è costituita da 4 domini omologhi BH1-4 e le proteine coinvolte possono essere antiapoptotiche se contengono tutti e 4 i domini e proapoptotiche se contengono meno di 4 domini. Tra le proapoptotiche vi è la proteina 3 che interagisce con la proteina Bcl2/adenovirus E1B 19kDa che viene utilizzata in autofagia attraverso l'interazione con la catena leggera proteica 3 associata ai microtubuli LC3 ed è in grado di regolare molti recettori per incorporare i mitocondri negli autofagosomi (Gao et al, 2020) (Chipuk et al, 2006).

La mitofagia ricopre un ruolo importante nella corretta funzione del muscolo scheletrico in quanto, per poter mantenere un'efficiente popolazione mitocondriale, occorre rimuovere i mitocondri disfunzionali (Quadrilatero, 2023). Nel muscolo la mitofagia si attiva a seguito di vari stimoli. In particolare, durante l'esercizio acuto, la necessità di ATP e la variazione del rapporto AMP/ATP provocato dallo stress energetico attiva AMPK che promuove un aumento del flusso mitofagico con conseguente localizzazione di PARKIN1 nei mitocondri.

È possibile misurare la sovraregolazione della mitofagia subito dopo l'esercizio acuto tramite LC3-II e p62 (Memme et al, 2021). Nella famiglia LC3/GABARAP, LC3-II è una piccola proteina che aumenta con l'attivazione della mitofagia poiché coinvolta nelle ultime sue fasi. Questa piccola proteina ha origine da LC3-I citosolico mediante taglio proteolitico di ATG4 e aggiunta di fosfatidiletanolamina. Invece la proteina p62, chiamata anche sequestosoma, diminuisce durante la mitofagia poiché a causa del legame con LC3 viene degradata dall'autofagosoma (Pankiv et al, 2007). Durante la mitofagia la chinasi PINK1 si accumula e, tramite l'ubiquitinizzazione delle proteine, attrae la proteina adattatrice p62. Il secondo meccanismo di targeting è mediato dai recettori Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting, definiti anche BNIP3 e NIX che come p62 si legano a LC3-II attivando il processo mitofagico.

L'induzione della mitofagia nel muscolo scheletrico si deve poi distinguere in base alla durata:

- **Esercizio acuto:** è stato osservato un aumento della mitofagia a 6 ore dopo l'esercizio su tapis roulant con fosforilazione di AMPK e ULK1. Con la misurazione della mitofagia tramite LC3-II e p62 e si è osservato un livello elevato fino a 90 minuti dopo l'attività. Questo aumento del processo con l'esercizio acuto non si verifica invece negli animali con knockout per la proteina Parkin;
- **Esercizio a lungo termine:** dopo 5 settimane di nuoto vi è un aumento della mitofagia basale. Questo aumento è stato osservato tramite l'aumentato rapporto LC3-II/LC3-I a favore di un aumento di LC3-II, la diminuzione di p62 e l'aumento di BNIP3 nelle fibre ossidative. L'allenamento di resistenza provoca nell'umano un'elevata fosforilazione di PINK1 e Parkin indicativa di un potenziamento del targeting mitofagico basale nel muscolo umano allenato.

La mitofagia risulta quindi sensibile allo stress energetico provocato nelle cellule muscolari e viene attivata durante l'esercizio per avviare il rimodellamento del pool mitocondriale esistente (Hood et al, 2019).

2.3 IL CATABOLISMO LIPIDICO

Le riserve di acidi grassi endogeni vengono mobilizzate dal tessuto adiposo per produrre energia. Il trasporto degli acidi grassi al torrente ematico avviene principalmente mediante il legame con l'albumina, mentre il loro trasferimento attraverso la membrana plasmatica delle cellule è reso possibile dall'azione di una delle seguenti tipologie di proteina:

- **Proteine di trasporto degli acidi grassi (FATP),** sono proteine transmembrana che migliorano l'assorbimento degli acidi grassi a lunga catena;
- **Traslocasi degli acidi grassi (FAT/CD36),** proteina di membrana che facilita l'assorbimento e il trasferimento di acidi grassi liberi mediante esterificazione;
- **Caveoline e proteine plasmatiche leganti gli acidi grassi di membrana (FABPpm),** famiglia di proteine di 14-15 kDa che si legano con elevata affinità a ligandi idrofobici e quindi agli acidi grassi a catena lunga, CoA e derivati, bilirubina, anioni organici e altre piccole molecole. Facilitano il trasferimento degli acidi grassi verso compartimenti cellulari specifici come ad esempio i mitocondri per l'ossidazione o il nucleo per la regolazione

dell'espressione genica (Longo et al, 2016). La famiglia di FABP è formata da 9 membri con modelli di espressione tessuto-specifici. La FABP3 è altamente espressa nel muscolo scheletrico infatti, studi su topi parzialmente carenti in FABP3, hanno evidenziato un ridotto utilizzo di acidi grassi. Questa isoforma 3 risulta particolarmente presente nel muscolo scheletrico invecchiato (Lee et al, 2020).

Nel muscolo giovane la corretta regolazione della proteina di trasporto degli acidi grassi FABP3 mantiene la normale fluidità di membrana, mentre durante l'invecchiamento viene sovraregolata inducendo una diminuzione delle catene aciliche insature. Questo rimodellamento lipidico contribuisce alle cause di riduzione della sintesi proteica diventando un ulteriore segnale intrinseco di perdita di massa e forza muscolare e limitando il recupero muscolare (Lee et al, 2020).

Una volta nella cellula, gli acidi grassi a catena lunga vengono trasformati in acil-CoA dalle acil-CoA sintasi (Gnoni et al, 2020). Gli acil-CoA possono essere veicolati ai mitocondri o ai perossisomi, che lavorano insieme per mantenere l'omeostasi lipidica. L'acil-CoA non riesce ad entrare nei mitocondri in forma libera per l'impermeabilità della membrana, e deve quindi essere prima coniugato alla carnitina, un derivato amminoacidico che viene accumulato all'interno della cellula tramite il trasportatore della carnitina OCTN2. Grazie alla carnitina palmitoil transferasi (CPT-1) la carnitina forma un legame estereo con gli acil-CoA formando acilcarnitina. Le acilcarnitine vengono trasferite nella matrice mitocondriale attraverso la membrana mitocondriale interna dalla carnitina acilcarnitina translocasi (CACT). Le acilcarnitine, una volta entrate all'interno del mitocondrio, vengono scisse dalla carnitina palmitoil transferasi (CPT-2) situata nella membrana mitocondriale interna che rimuove la carnitina dalle acilcarnitine rigenerando l'acil-CoA iniziale. A questo punto la carnitina ritorna nel citoplasma della cellula per essere riutilizzata nuovamente, mentre gli acil-CoA danno inizio all'ossidazione degli acidi grassi (Longo et al, 2016).

L'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi si compone di 3 fasi:

1. β -ossidazione: avviene la degradazione degli acidi grassi con formazione di 8 acetil-CoA e produzione di 28 elettroni;
2. Ossidazione dell'acetil-CoA ad anidride carbonica attraverso il ciclo dell'acido citrico con la produzione di 16 CO₂ e 64 e⁻;

3. Fosforilazione ossidativa: gli elettroni prodotti nelle prime due fasi servono per ridurre i trasportatori di elettroni NAD^+ e FAD a NADH e FADH_2 . Questi coenzimi donano gli elettroni che hanno ricevuto alla catena respiratoria dei mitocondri e, attraverso la catena, gli elettroni vengono poi trasferiti all' O_2 fornendo così l'energia necessaria attraverso la sintesi di ATP (David L. Nelson & Michael M. Cox, 2015).

L'ossidazione dei grassi risulta un'importante fonte di produzione di energia nel muscolo scheletrico. In condizioni fisiologiche per il muscolo, delle tre fonti di energia metabolica a disposizione del nostro organismo (carboidrati, lipidi e proteine), quelli utilizzati in via preferenziale, durante il riposo e l'esercizio, sono i lipidi e i carboidrati. I grassi contengono più del doppio di energia rispetto ai carboidrati (1g di grassi apporta 9kCal, 1 g di carboidrati solamente 4kCal). (Ranallo et al, 1998)

L'intensità dell'esercizio gioca un ruolo importante nella regolazione del metabolismo del substrato. All'aumentare dell'intensità dell'esercizio svolto, con conseguente aumento della percentuale di assorbimento di O_2 , corrisponde una diminuzione della produzione d'energia derivante dai grassi e un aumento di quella ottenuta dall'ossidazione dei carboidrati. Al contrario, gli adattamenti indotti dall'allenamento di resistenza si traducono in un risparmio di carboidrati e una percentuale maggiore di energia fornita dall'ossidazione dei grassi (Holloszy et al, 1998).

L'intensità relativa dell'esercizio è generalmente espressa come percentuale della capacità massima di assorbimento di ossigeno in un individuo $\text{VO}_2 \text{ max}$ che varia a seconda di fattori come livello di allenamento aerobico, del corredo genetico, dell'età, dello stato di salute e del sesso. La stessa intensità di esercizio viene infatti raggiunta con ritmi differenti e con $\text{VO}_2 \text{ max}$ diverse tra gli individui (Holloszy et al, 1998). Un esercizio di intensità lieve o moderata con consumo massimo di ossigeno $\text{VO}_2 \text{ max}$ di 25-65% è associato ad un aumento dell'ossidazione dei grassi di 5-10 volte rispetto ad una condizione di riposo (Ranallo et al, 1998).

L'Acetil-CoA derivato dalla β -ossidazione inibisce l'enzima piruvato deidrogenasi coinvolto nella respirazione cellulare del glucosio. Al contrario, la L-carnitina stimola la produzione di piruvato deidrogenasi nel muscolo umano con riduzione dell'Acetil-CoA che viene convertito in acilcarnitina. Le concentrazioni plasmatiche di acilcarnitina vengono spesso utilizzate come marcatori dell'ossidazione degli acidi grassi poiché un loro aumento nel tempo implica un'inflessibilità metabolica (McCann et al, 2021). Un insufficiente metabolismo degli acidi

grassi nei mitocondri porta ad una diminuzione di energia data da una carente formazione di ATP (Dambrova et al, 2022).

2.4 LA SARCOPENIA

Il mantenimento di una rete mitocondriale sana a livello muscolare è di fondamentale importanza per poter rispondere in modo corretto sia agli adattamenti fisiologici che agli stimoli stressori durante tutto l'arco della vita (Pickles et al, 2018).

La patologica perdita di massa muscolare di certi individui anziani viene definita come sarcopenia. Nell'individuo anziano vi è un'incapacità di recuperare completamente la massa muscolare e la forza portando ad un'alternanza di periodi acuti di perdita muscolare accompagnati da recuperi incompleti (Coen et al., 2019). Nei casi di sarcopenia, questa condizione risulta problematica poiché, compromettendo la funzionalità muscolare, influisce negativamente anche sulla qualità di vita.

Aumentando il rischio di lesioni gravi e riducendo la capacità di partecipazione e di svolgimento delle normali attività di vita quotidiana anche il grado di indipendenza tende a calare (Webb, 2003). Durante l'invecchiamento si ha un progressivo e irreversibile declino causato da fattori genetici, stocastici e ambientali che porta ad una ridotta capacità di adattamento (Figueiredo et al, 2008). Nelle cellule muscolari si osserva una perdita di contenuto e funzione mitocondriale. Il naturale processo d'invecchiamento riduce il contenuto e l'integrità mitocondriale compromettendo la sintesi proteica, la respirazione, aumentando il disaccoppiamento del consumo di O₂ e diminuendo la sintesi di ATP. In particolare si osserva una diminuzione della trascrizione del gene PGC-1 α che porta ad una conseguente riduzione dei livelli di PGC-1 α accompagnata da una maggiore metilazione del promotore, che ne causa la repressione, e da un alterato equilibrio dei fattori di trascrizione regolatori di PGC-1 α (Memme et al, 2021).

La perdita dell'omeostasi proteica mitocondriale (proteostasi) (**figura 3**) è una delle principali cause dell'invecchiamento che porta ad una mal regolata attività di biogenesi e mitofagia. Con il progredire dell'età si evidenzia un accumulo di proteine mitocondriali danneggiate e disfunzionali in quanto i mitocondri riducono la capacità di essere creati *de novo*. L'accumulo di mitocondri disfunzionali nel muscolo scheletrico dei soggetti anziani conferma la compromissione mitofagica concomitante all'invecchiamento. L'invecchiamento mitocondriale nel muscolo scheletrico risulta sempre più sensibile all'apertura del poro di

transizione della permeabilità mitocondriale MPT che porta ad una deplezione di ATP con perdita del potenziale di membrana. La biogenesi mitocondriale viene mantenuta, ma possono verificarsi maggiori errori di traduzione dell'mRNA ed errati ripiegamenti delle proteine nascenti (Drake & Yan, 2017).

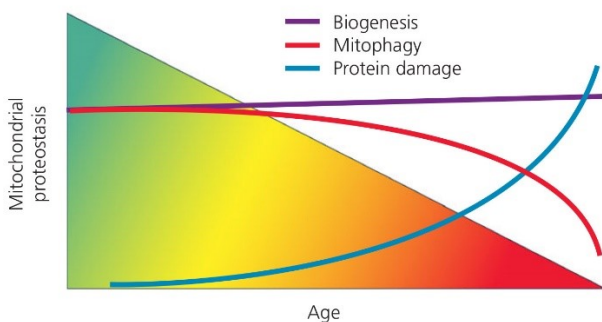


Figura 3: Rappresentazione della disfunzione mitofagica con l'avanzare dell'età.

L'invecchiamento porta ad un danno proteico conseguente ad una diminuzione mitofagica (Drake & Yan, 2017, figura 1).

La mancanza di istoni nella struttura mitocondriale porta il mtDNA ad essere particolarmente sensibile ai danni indotti dallo stress. Le mutazioni del mtDNA potrebbero essere eliminate dalla mitofagia (Yan et al, 2019) che però, in relazione alla perdita della proteostasi mitocondriale, con il progredire dell'età tende a subire un'alterazione della normale attività (Drake & Yan, 2017).

A favorire ulteriormente l'instaurarsi di una condizione di sarcopenia in età avanzata, è la tendenza ad una presenza elevata di FABP3 nel tessuto muscolare scheletrico dei soggetti anziani che comporta l'alterazione della normale composizione e fluidità delle membrane lipidiche con conseguente promozione di stress reticolo endoplasmatico e diminuzione di sintesi proteica.

La capacità aerobica tende a diminuire con l'età suggerendo una relazione tra la velocità di deambulazione dell'anziano e VO_2 max. Il muscolo non riesce a convertire in maniera adeguata l'assorbimento di O_2 in ATP. Questo dato può essere sfruttato per monitorare la sarcopenia (Coen et al., 2013).

Le cellule diventano quindi sempre più vulnerabili e non riescono a reagire in maniera sufficiente agli stress ossidativi aumentando così le probabilità di perdita delle funzioni biochimiche della cellula. In condizioni fisiologiche la catena respiratoria consuma più del 90% di O₂ assorbito e converte il 5% in superossido, un radicale libero dell'ossigeno (ROS) dalla quale possono formarsi altre tipologie di ROS. Con l'avanzare dell'età, mutazioni del mtDNA portano alla produzione di componenti disfunzionali che compromettono la catena. Tutto ciò si tramuta in un alterato processo di fosforilazione ossidativa che porta ad un aumento dei ROS che non vengono a sufficienza eliminati (McCormick & Vasilaki, 2018)(Webb, 2003).

L'attività fisica è un fattore che influenza in modo significativo il graduale invecchiamento muscolare. Da uno studio sull'autofagia, in correlazione all'età nel muscolo plantare dei ratti Fisher 344 maschi, è emerso che l'esercizio fisico svolto in tutta la vita (combinato ad una dieta ipocalorica dell'8%) riduce i danni proteici correlati all'età con conseguente ripristino dell'espressione proteica di Atg7, Atg9 e Lamp2 (Wohlgemuth et al, 2010). L'esercizio risulta quindi un potente mezzo di promozione della proteostasi mitocondriale che rallenta il declino della mobilità e delle prestazioni correlate all'anzianità (Drake & Yan, 2017).

Il declino della massa muscolare scheletrica inizia durante la terza o quarta decade di vita con una perdita del muscolo di circa il 10% entro i 50 anni. Successivamente il tasso di perdita accelera portando ad una diminuzione dello 0,7 - 0,8% nella settima e ottava decade di vita. Questo decadimento è dovuto ad una riduzione del numero e delle dimensioni delle fibre e delle miofibrille (Distefano & Goodpaster, 2018). A livello delle singole fibre si osserva una rigidità istantanea dovuta ad una perdita di elasticità. Lo stress ossidativo può modificare i filamenti di miosina che interrompono i loro legami con l'actina portando ad un minor numero di ponti trasversali actina-miosina (Frontera & Ochala, 2015).

L'atrofia si ha principalmente nelle fibre di tipo 2 a contrazione rapida dove, nei soggetti anziani, sono state osservate riduzioni del 10-40% della loro massa. La riduzione di queste fibre, responsabili dell'esercizio ad alta intensità e fatica, compromette le normali attività di vita quotidiana e la performance fisica (Talbot & Maves, 2016)(Tieland et al, 2018).

Per ridurre tali problematiche il mantenersi in forma con una costante attività fisica ed allenamento risulta un'ottima soluzione. La mancanza di esercizio fisico regolare porta infatti ad una perdita di mobilità con l'invecchiamento (Tieland et al, 2018). L'inattività fisica indotta ad esempio dall'allettamento può portare ad un più veloce declino del muscolo senza possibilità

di ripristino. Al contrario, l'esercizio di resistenza, favorisce l'ipertrofia muscolare migliorando significativamente la diminuzione delle miofibrille (Distefano & Goodpaster, 2018). Un allenamento aerobico aumenta l'area della sezione trasversale delle fibre e i suoi effetti ipertrofici dipenderanno dalla sua frequenza, intensità e durata (McCormick & Vasilaki, 2018).

CAPITOLO 3: L'UROLITINA

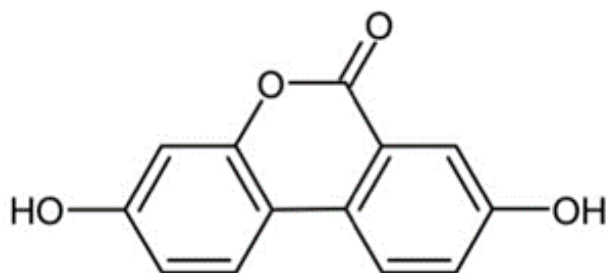


Figura 4: Urolitina A (Ryu et al., 2016, figura 1a)

3.1 GLI ELLAGITANNINI

I tannini sono composti fenolici suddivisi in idrolizzati e condensati. I tannini idrolizzati sono polifenoli complessi, generalmente costituiti da uno zucchero esterificato con acido gallico (gallotannini) o ellagico (ellagitannini). Gli ellagitannini (ET) formano il più grande gruppo di tannini conosciuto poiché sono i costituenti di molte famiglie di piante. In particolare gli ET sono presenti in un'ampia gamma di alimenti di origine vegetale tra cui: melograno, frutti di bosco (fragola, lamponi, mora, mirtillo rosso), frutti tropicali (jaboticaba, camu camu), frutta secca (noci, noci pecan, castagne, anacardi, ghiande di quercia), uva, vini e alcolici invecchiati in rovere come il whisky, tè verde e nero, rosa canina, olivello spinoso. In particolare il melograno contiene alti livelli di ET sia nel frutto in sé che nel succo contenente tannini estratti dalla buccia. In generale con la maturazione dei frutti aumentano anche le concentrazioni di polifenoli (Aguilera-Carbo et al, 2008; Bakkalbaşı et al, 2009; Espín et al, 2013; Ares et al, 2023).

Gli ET risultano stabili nell'ambiente acido dello stomaco e vengono classificati come nutraceutici poiché possiedono un'elevata attività biologica e proprietà benefiche come antiossidanti, antinfiammatori, antitumorali, antimicrobici e in generale migliorano la salute dei vasi sanguigni (Lipińska et al, 2014).

Inoltre gli ET mostrano un effetto prebiotico, dimostrato sia in vivo in modelli animali sia in vitro e in vivo nell'uomo, favorendo la crescita di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Tomás-Barberán et al, 2017).

Strutturalmente gli ET sono costituiti da una o più frazioni esaidrossidifenoliche (HHDP) esterificate con uno zucchero, solitamente glucosio. Le frazioni HHDP possono legarsi in modo differente con la porzione di glucosio e ciò porta ad avere un'ampia variabilità di struttura. La classificazione può essere quindi fatta in base alle diverse strutture monomeriche che a loro volta polimerizzano o subiscono processi di idrolisi.

La polimerizzazione degli ET monomerici in ET oligomerici o polimerici avviene mediante legame ossidativo carbonio-ossigeno tra il gruppo HHDP e il gruppo galloile. Tutto ciò porta ad insolubilizzazione e attacco alla parete cellulare mediante legame covalente. L'idrolisi, invece, avviene grazie all'azione della tannasi (tannino acil idrolasi), un enzima di degradazione prodotto principalmente da microorganismi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*. Questo processo avviene anche nell'uomo dove, dopo assunzione di alimenti contenenti ET, la biodegradazione avviene da parte della microflora intestinale. L'idrolizzazione dei legami esteri con acidi o basi, porta alla riorganizzazione spontanea del gruppo HHDP in acido ellagico (EA) tramite delattonizzazione.

L'EA, dilattone dell'HHDP, ha un peso molecolare di 338,2 g/mol ed è costituito da una frazione idrofila formata da due lattoni e una frazione lipofila formata da quattro anelli fenolici che lo rendono altamente termostabile e insolubile in acqua. Risulta tuttavia solubile in metanolo acidificato, etanolo e dimetilsolfato. Per la caratterizzazione e la quantificazione dell'EA e degli ET, il processo di estrazione maggiormente utilizzato è l'estrazione con acetone-acqua in rapporto 7:3 con temperature di 60 gradi e costante agitazione (Aguilera-Carbo et al, 2008; Espín et al, 2013).

L'EA non deriva solo dagli ET, ma può essere presente anche in forma libera in altre piante che non contengono ET. Per questo motivo l'EA può essere utilizzato come biomarcatore della biodisponibilità dietetica degli ET o come indicatore chimico della presenza o meno di tannini idrolizzabili (Lipińska et al, 2014). Sempre attraverso il microbiota intestinale a livello del colon, l'EA può ulteriormente perdere uno dei due lattoni tramite decarbossilasi e rimuovere uno o più ossidrili tramite deidrossilasi portando alla formazione di Urolitine (Espín et al, 2013).

Le Urolitine sono state scoperte prima in modelli sia animali poi nell'uomo e ad oggi sono state descritte 13 Urolitine con annessi metaboliti coniugati, rilevati in diversi fluidi e tessuti umani quali urina, sangue, feci, latte materno, prostata, colon, mammella (García-Villalba et al, 2022). Il nome Urolitine è generico e comprende tutti i diversi derivati idrossilati del 6H-dibenzo[b,d]piran-6-one. (Tomás-Barberán et al, 2017).

Il primo metabolita formato dalla decarbossilazione dell'EA è la pentaidrossi urolitina (Uro M5) e da questo, mediante successive rimozioni degli ossidrili, si formano diversi isomeri di tetraidrossi urolitina.

Da Uro M5 possono infatti formarsi 2 tetraidrossi urolitine:

- Uro D, che può a sua volta deidrossilare in Uro C;
- Uro M6, tetraidrossibenzopiran-6-one, che può a sua volta deidrossilare in Uro C e Uro M7.

Successivamente la deidrossilazione porta alla formazione di diidrossi urolitine:

- IsoUrolitina A (IsoUroA), derivata da Uro C;
- Urolitina A (Uro A), derivata sia da Uro C che da Uro M7.

Infine la rimozione dell'ossidrile porta alla formazione di monoidrossi urolitine:

- IsoUrolitina B (IsoUro B), derivata da IsoUroA;
- Urolitina B (Uro B), derivata sia da IsoUro A che da Uro B. (*figura 5*)

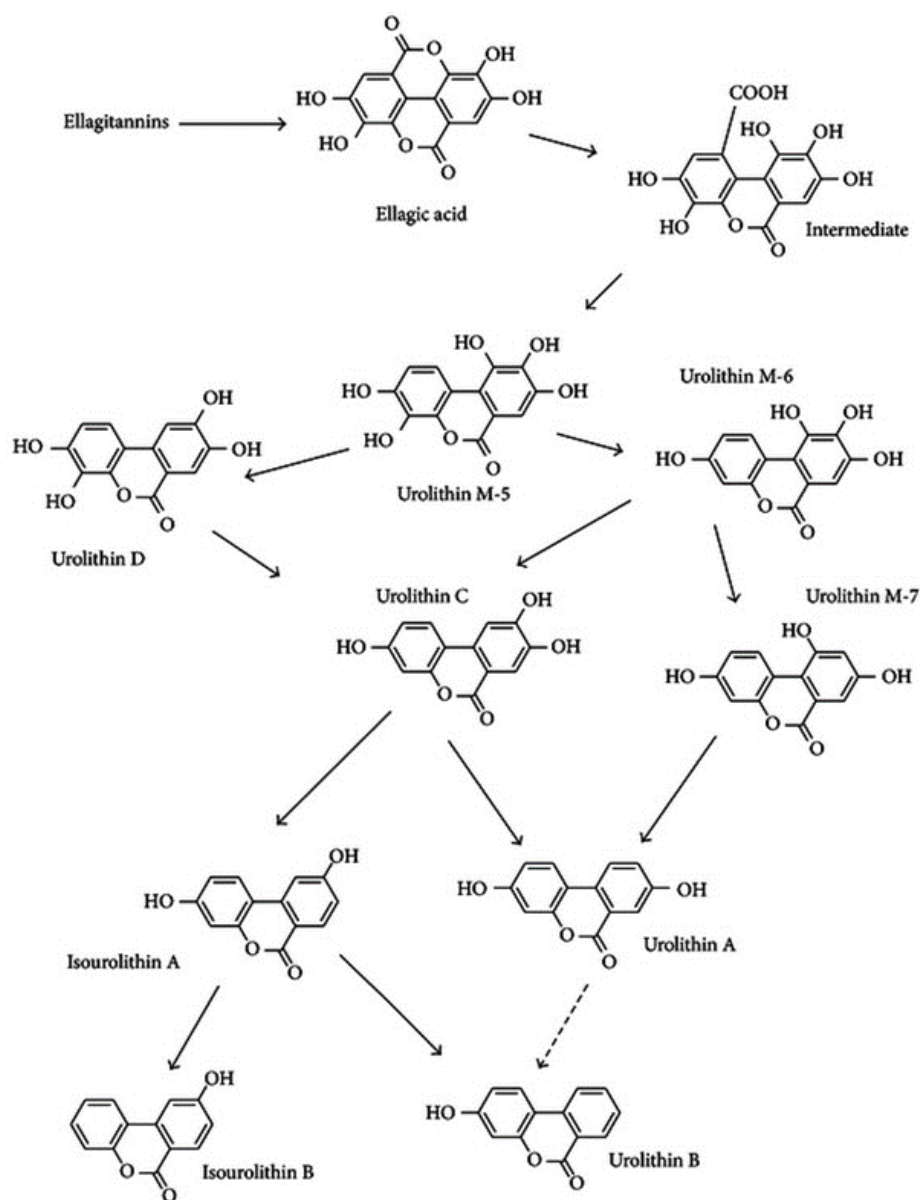


Figura 5: *Metabolismo degli Ellagitannini nelle varie Urolitine (Espín et al., n.d, figura 2)*

Per il momento non sono state riscontrate ulteriori degradazioni di Uro B e IsoUro B, sebbene l'ipotesi non debba essere scartata (Espín et al, 2013)(Hasheminezhad et al, 2022).

Le Urolitine, rispetto a EA e ET, risultano molto meglio assorbite dall'organismo. Le urolitine assorbite subiscono poi metabolismo di fase I e II, ossia metilazione, glucuronazione con acido glucuronico e solfatazione con solfati, aumentando così la loro solubilità nel plasma e facilitando l'escrezione (Ares et al, 2023)(Kujawska & Jodynis-Liebert, 2020).

L'attenzione per le Urolitine è rivolta specialmente a UroA il cui nome IUPAC è 3,8-dihydroxybenzo[c]chromen-6-one e il suo InChI: 1s/C13H8O4/c14-7-1-3-9-10-4-2-8(15)6-12(10)17-13(16)11(9)5-7/h1-6,14-15H. La Food & Drug Administration ha definito il suo utilizzo “per uso come ingrediente in frullati proteici in polvere (ricostituiti), bevande (frullati proteici pronti da bere, bevande sostitutive del pasto non a base di latte, farina d'avena istantanea, barrette proteiche e nutrizionali e yogurt (yogurt greco, yogurt ad alto contenuto proteico, e bevande allo yogurt) a livelli di consumo tipici di 500 mg/dose o 1000 mg/dose”.

In Europa Amazentis (azienda svizzera operante nel settore delle scienze biologiche fondata da Nestlé Health Science, dedicata a ricerche cliniche innovative al fine di dare vita a prodotti nutrizionali terapeutici) ha presentato la domanda di approvazione dell'Urolitina A come nuovo ingrediente alimentare, ai sensi del Regolamento (UE) n. 2015/2283 sui Novel Food, ossia quei prodotti alimentari privi di uno storico legato al loro consumo in UE all'anno 1997 e per la cui immissione in commercio è necessaria un'autorizzazione da parte dell'autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA). La domanda presentata il 31 Agosto 2018 richiedeva, vista la sua sicurezza, l'utilizzo dell'Uro A come “ingrediente in cereali per la colazione calda istantanea (esclusi gli alimenti trasformati a base di cereali), barrette di cereali, barrette proteiche e barrette nutrizionali destinate ad atleti, yogurt aromatizzati e bevande allo yogurt (esclusi gli alimenti per l'infanzia), budini a ridotto contenuto calorico e budini a ridotto contenuto energetico per adulti, drink vitaminici, sostituti del pasto per sportivi e per la perdita di peso, bevande e polveri nutrizionali, alimenti integratori e alimenti ai fini medici speciali (esclusi prodotti per lattanti e bambini)”(Amazentis, 31 August 2018)

L'EFSA, durante l'incontro del 3-5 Maggio 2023, ha valutato i dati presentati da Amazentis riguardanti le caratteristiche del prodotto, le modalità di processazione del prodotto, gli usi proposti, la tossicologia e i vari studi effettuati, e ha ritenuto necessarie ulteriori informazioni da parte del richiedente per procedere con la valutazione scientifica della domanda. (Aguilera-Gómez et al, 2023)

Questo fu il primo composto della famiglia delle urolitine ad essere stato scoperto nel 1949 isolandolo dalle ghiandole odorose essiccate del castoreo (Tomás-Barberán et al, 2017). Dalle sue proprietà chimico-fisiche emerge una buona propensione per la molecola di essere attiva per via orale a causa dell'aumentata lipofilia. Questo è intuibile poiché soddisfa le Regole di Lipinski nella quale viene stabilito che un buon assorbimento orale si ha quando:

- Massa molecolare (PM) è inferiore a 500 g/mol: PM UroA calcolato da PubChem è di 228,20;
- Logaritmo del coefficiente di ripartizione LogP UroA è inferiore a 5: LogP calcolato da XLogP3 è di 2.3;
- Gli accettori di legami idrogeno sono inferiori a 10: il conteggio degli accettori di legame idrogeno di UroA calcolato con Cactvs conta 4 accettori;
- I donatori di legame idrogeno sono inferiori a 5: il conteggio dei donatori di legame idrogeno di UroA calcolato con Cactvs conta 2 donatori

(pubChem) (Hasheminezhad et al, 2022).

3.2 L'INTERINDIVIDUALITÀ

Il metabolismo degli ET risulta complesso e cambia da individuo a individuo suggerendo l'idea che esista, per ogni soggetto, un metabolismo diverso e quindi una risposta biologica diversa. Il metabolismo viene influenzato da un insieme di fattori quali la fonte alimentare, il rapporto tra ET e EA, l'associazione con altre sostanze fitochimiche nello stesso alimento, il diverso tasso di assorbimento, il diverso microbiota e lo stato di salute. Il tratto gastrointestinale umano è colonizzato da un'ampia varietà di microorganismi con numero superiore a dieci volte il numero totale di cellule umane, tra cui batteri, virus, funghi e protozoi, che assieme formano il microbiota intestinale.

Il microbiota è coinvolto nella biotrasformazione delle sostanze alimentari e risulta differente da individuo a individuo. Questa differenza fa sì che vi siano, a seconda della persona, differenti composti metabolici (Hasheminezhad et al, 2022)(Kujawska & Jodynis-Liebert, 2020).

Per quanto riguarda l'Urolitina, una prima stratificazione divideva produttori e non produttori di questo metabolita, correlato alla capacità individuale di metabolizzare o meno ET ed EA. Per i metaboliti degli ET è possibile individuare tre tipologie di fenotipi che differiscono per la diversa capacità di formazione delle urolitine:

- Fenotipo 0: non produce Uro A, IsoUro A, Uro B. Costituisce il 5 – 15%;
- Fenotipo A: produce Uro A e i relativi coniugati. Costituisce il 25 – 80%;

- Fenotipo B: produce Uro A, IsoUro A, Uro B. Costituisce il 10 – 50%

(Tomás-Barberán et al, 2017; Kujawska & Jodynis-Liebert, 2020; Hasheminezhad et al, 2022).

La presenza di un metabotipo rispetto ad un altro influenza il metabolismo e la bioattività dei polifenoli e questo comporta una differente risposta.

A seconda delle caratteristiche individuali dei soggetti, la trasformazione degli ET in Urolitine differisce in velocità ed efficienza. Uno studio ha esaminato il metabolismo batterico intestinale dei sottoprodotti del melograno e delle punicalgine (polifenoli principali del melograno) utilizzando come sistema di fermentazione un modello di coltura batch a pH controllato e sono state riscontrate diverse concentrazioni di Urolitina nel plasma, nelle urine e nelle feci. Per quanto riguarda la composizione del microbiota intestinale umano si osservano differenze tra individui, probabilmente a causa della presenza di diverse composizioni del microbiota intestinale da persona a persona (Bialonska et al, 2010; Hasheminezhad et al, 2022).

Un altro Studio di Coorte ha osservato i vari metaboliti su 839 volontari con età compresa da 5 a 90 anni:

- Gli individui che non producono Urolitina sono il 10%, e in questi la percentuale non è variata in relazione all'età;
- Gli individui che producono Urolitina sono il 90%, e in questi è possibile osservare un aumento di Urolitina B e una diminuzione di Urolitina A con l'età. Queste variazioni risultano marcate nel passaggio dai 20 ai 40 anni.

La distribuzione dei metaboliti risulta quindi influenzata anche dall'invecchiamento (Cortés-Martín et al, 2018). Ad oggi non è ancora del tutto chiaro quali siano i ceppi batterici che producono Urolitina A. Studi sulla produzione di urolitine dall'EA e ET da parte del microbiota intestinale hanno identificato alcuni gruppi batterici responsabili della produzione di questi metaboliti come ad esempio il gruppo *Clostridium Coccoides*, il gruppo *Clostridium Leptum*, il genere *Bifidobacterium*, i *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus*, i gruppi *Bacteroides* e *Prevotella* e le specie di *E.Coli* (García-Villalba et al, 2013).

CAPITOLO 4: GLI STUDI SULL'UROLITINA

4.1 LA SICUREZZA DEL PROFILO TOSSICOLOGICO

Dagli studi tossicologici l'Uro A risulta sicura. Uno studio di tossicità acuta e subcronica nei ratti e nei topi non ha evidenziato cambiamenti tossicologici significativi, dopo somministrazione di estratto di melograno contenente ET, in correlazione a osservazioni cliniche e peso corporeo. La tossicità acuta è stata studiata nei ratti Wistar ed è stata determinata come dose letale al 50% negli animali (DL50) una quantità superiore ai 5000 mg/kg di peso corporeo (indicazione utilizzata come riferimento per gli studi clinici). La somministrazione dell'estratto è avvenuta in 14 giorni consecutivi e non ha portato ad alcun effetto tossico né nei ratti né nei topi.

È stata studiata anche la tossicità subcronica dei ratti del ceppo Wistar in cui, dopo essere stati divisi casualmente in 6 gruppi, a 4 gruppi sono state somministrate oralmente dosi di estratto rispettivamente di 0 - 60 - 240 - 600 mg/kg/giorno per 90 giorni e a 2 gruppi sono state somministrate oralmente dosi di estratto rispettivamente di 0 e 600 mg/kg/giorno e sono stati osservati anche per i successivi 28 giorni. Tutti i ratti sono sopravvissuti fino al termine del test senza il verificarsi di effetti significativi sul peso corporeo. Rispetto al gruppo di controllo i ratti non hanno riportato cambiamenti significativi nemmeno per quanto riguarda i parametri relativi all'analisi delle urine che comprendevano volume, peso specifico, colore, pH, albumina, zucchero, globuli rossi, globuli bianchi. Anche i parametri ematologici sono rimasti invariati evidenziando valori medi delle concentrazioni di globuli rossi e di emoglobina simili a quelli del gruppo di controllo (Patel et al, 2008).

Un altro studio sui ratti Sprague-Dawley, con somministrazione orale crescente di ET da 0,39 a 1,18 g/giorno di estratto di melograno, ha valutato gli effetti tossicologici dopo 37 giorni confermando un ampio margine di sicurezza degli ET, tramite analisi istopatologica nel fegato e nel rene, e l'assenza di tossicità (Cerdá et al, 2003).

Un altro studio, invece, ha verificato il livello di sicurezza direttamente dell'Uro A. È stata valutata mediante il test di Ames la possibile mutagenicità genetica dell'Uro A. Vengono utilizzati ceppi batterici di Salmonella, i quali non sono in grado di sopravvivere e crescere in assenza di istidina. Normalmente questi batteri sintetizzano autonomamente l'istidina necessaria alla loro crescita ma, a causa di eventuali mutazioni genetiche, possono non essere

più in grado di riprodurla. La sostanza studiata dal test di Ames viene considerata mutagena se il suo trattamento produce nei ceppi batterici di Salmonella un aumento del numero di colonie (Zeiger, 2019). Le piastre hanno mostrato uno sfondo normale per tutti i ceppi testati indicando che Uro A non induce mutazioni geniche. È stato effettuato anche il test del micronucleo in vivo che ha confermato su modello animale un'ulteriore prova della non mutagenicità dell'Uro A. Se l'Uro A fosse una sostanza mutagena per la cellula, in fase mitotica una parte di cromosomi aberranti (definiti micronuclei) si ritroverebbe libera nel citoplasma (Vanhauwaert et al, 2001). Il test del micronucleo in vivo su animali tramite fluorescenza non ha osservato nessun micronucleo dopo il trattamento con Uro A. Dopo trattamento di 90 giorni non è stato rilevato alcun potenziale citotossico. Negli stessi 90 giorni è stato fatto uno studio farmacocinetico sull'assorbimento, sul metabolismo, la distribuzione ed eliminazione (ADME) utilizzando sia somministrazione orale che endovenosa di UA radiomarcato (3,8-diidrossi-6H-benzo[c] [Ph U – 14C] chromen – 6 – one) e non è stato osservato alcun effetto avverso e nessuna mortalità in ciascuna delle dosi date (834, 1684, 3451 mg/kg peso corporeo/giorno per i maschi e 896, 1876, 3826 mg/kg peso corporeo/giorno per le femmine) (Heilman et al, 2017).

Il primo studio clinico di Fase 1 nell'uomo, ha analizzato la sicurezza dell'Uro A in anziani sani e sedentari a seguito di una somministrazione orale protratta per 4 settimane di placebo o di Uro A di 250 mg, 500 mg, 1000 mg e 2000 mg, sia come dose singola che come dose multipla. I test di sicurezza di laboratorio sono stati fatti prima e dopo la somministrazione e non hanno riscontrato particolari effetti avversi. Coerentemente con gli studi riguardanti il modello animale, Uro A non ha portato ad alcun effetto tossico rilevante nell'uomo (Andreux et al, 2019).

Sulla base delle informazioni fornite dall'azienda svizzera Amazentis, l'Uro A risulta GRAS (Generally Recognized As Safe – generalmente riconosciuta come sicura) (Hahn & Lovells, 2018).

4.2. GLI STUDI PRECLINICI SUL MODELLO ANIMALE

Gli effetti sul muscolo scheletrico sono stati studiati in vitro e in vivo in alcuni modelli animali.

I vermi *Caenorhabditis Elegans* (*C. Elegans*) sono organismi modello molto utilizzati negli studi di invecchiamento (Stroustrup et al, 2013) (Ishii et al, 2013).

Uno studio sui vermi *C. Elegans* ha preso in considerazione gli effetti che poteva avere l'Urolitina A nel muscolo scheletrico (Ryu et al, 2016). I ceppi *C. Elegans* sono stati coltivati a 20° su piastre agar seminando il ceppo *E. Coli* OP50, ceppo batterico molto utilizzato come alimento per il mantenimento in laboratorio di *C. Elegans* (Arata et al, 2020), nel terreno di crescita. I vermi sono stati esposti ai diversi composti per tutto l'arco della vita, dalle uova alla morte, salvo casi specificati. Le piastre sono state cambiate due volte a settimana. Tra tutti i metaboliti degli ET, nello studio è stata presa in considerazione l'Uro A perché, valutando le differenze relative alla durata di vita, dopo somministrazione di 50 µM di EA, Uro A, Uro B, Uro C e Uro D, si nota un aumento della sopravvivenza significativo ($P < 0,001$) dopo assunzione di Uro A (pari al 45,5%), superiore rispetto al controllo e rispetto agli altri composti. L'EA non ha avuto effetti sulla durata della vita, l'Uro A invece ha quasi raddoppiato la durata di vita garantendo una maggior sopravvivenza (survival) (**figura 6**).

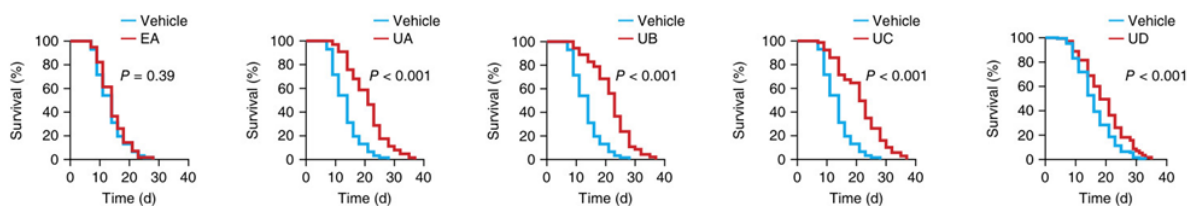


Figura 6: Rappresentazione della sopravvivenza (% survival) nel tempo (time) del trattamento in *C.Elegans* con vari metaboliti degli ET rispetto al veicolo di controllo: acido ellagico EA non ha portato a differenze significative ($P=0,39$) invece Urolitina A, B, C e D rispettivamente UA, UB, UC, UD hanno aumentato in modo significativo ($P < 0,001$) la sopravvivenza del verme. (Ryu et al., 2016, figura 1b)

In particolare è stato osservato un effetto dose-risposta: all'aumentare delle concentrazioni di Uro A l'effetto sull'allungamento della vita aumenta. Passando da concentrazioni di Uro A di 10 μM , 30 μM , 50 μM si osserva un rispettivo aumento del tempo di vita all'aumentare della dose (**figura 7**) e, alla luce di queste osservazioni, è stato studiato il tasso di mortalità sull'Uro A 50 μM riscontrando un ritardo significativo ($P \leq 0,001$) del tasso di mortalità. (**figura 8**)

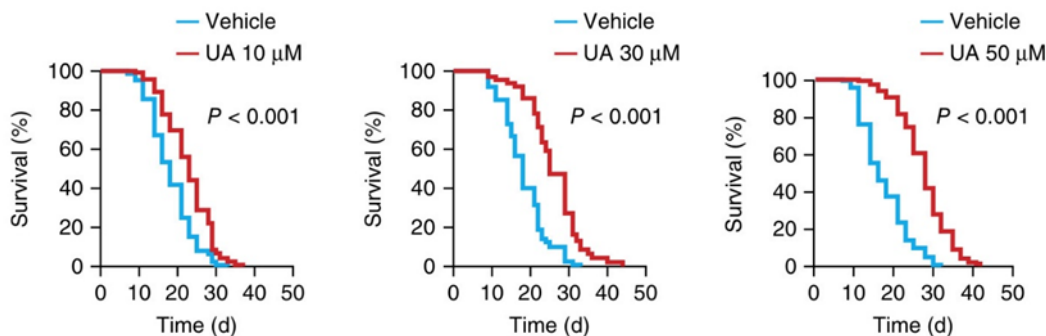


Figura 7: Rappresentazione della sopravvivenza (%survival) nel tempo (time) del trattamento in *C.Elegans* con Urolitina A in concentrazioni di 10 μM , 30 μM , 50 μM rispetto al veicolo di controllo. Tutte le concentrazioni aumentano significativamente ($P < 0,001$) rispetto al non trattamento. (Ryu et al., 2016, figura 1c)

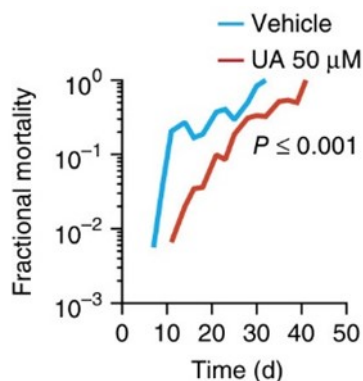


Figura 8: Rappresentazione del tasso di mortalità (fractional mortality) nel tempo calcolato in giorni (d day) del trattamento in *C.Elegans* con Urolitina A UA 50 μM rispetto al veicolo di controllo. Si osserva una durata significativamente maggiore ($P \leq 0,001$) nel tempo con UA rispetto al veicolo che supera i 40 giorni. (Ryu et al., 2016, figura 1d)

C.Elegans alimentato su piastra con E. Coli OP50 o HT115 è risultato più longevo in termini di sopravvivenza, specialmente in OP50. L'aumento avviene per effetto diretto sui vermi, e non come conseguenza di un effetto indiretto sui batteri con i quali C. Elegans veniva alimentato. È stato osservato infatti un aumento della durata di vita del verme in C.Elegans mantenuti con batteri OP50 uccisi con UV e trattati con Uro A 50 μ M rispetto a quelli non trattati. Mediante Long Rank Test sono state confrontate le distribuzioni di sopravvivenza nel controllo e con Uro A, evidenziando un aumento significativo ($P < 0,001$) della durata di vita dopo il trattamento. **(figura 9)** Hanno dimostrato che l'Uro A non influenza né il metabolismo batterico né la quantità di batteri disponibili, tanto meno l'assunzione di cibo in C. Elegans. L'aumento della media della durata di vita con Uro A avviene quindi per effetto diretto sui vermi C. Elegans e non come conseguenza di un effetto diretto sui batteri.

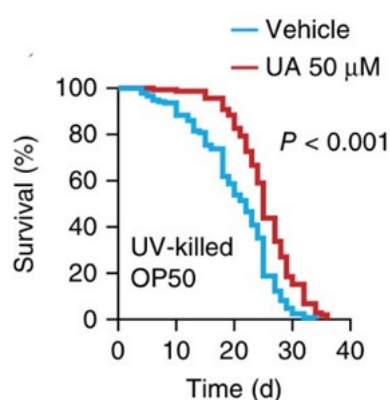


Figura 9: Rappresentazione della sopravvivenza (%survival) nel tempo calcolato in giorni (d day) del trattamento in C.Elegans con Urolitina A UA 50 μ M rispetto al veicolo di controllo. Si osserva una sopravvivenza significativamente maggiore ($P < 0,001$) nel tempo con UA rispetto al veicolo (Ryu et al., 2016, figura 1e)

Per allungare la vita dei vermi è stata osservata una correlazione della somministrazione di Uro A con la funzione mitocondriale. Per dimostrare ciò sono stati messi a confronto dei comuni vermi wild-type con vermi con mutante mev-1. La mutazione determina nei vermi una diminuzione dell'80% di attività del complesso CII che compromette la sua capacità nel partecipare al trasporto di elettroni (Ishii et al, 2013) e, rispetto ai vermi wild-type, impedisce l'allungamento di vita dopo somministrazione con Uro A.

Per quanto riguarda la biogenesi mitocondriale, il trattamento con Uro A a breve e a lungo termine ha portato a risposte differenti:

- Nei vermi giovani (giorno 1) trattati con UroA, è stata osservata una diminuzione del contenuto mitocondriale nelle cellule muscolari, con relativa diminuzione del rapporto mtDNA/nDNA e una minor espressione di alcune subunità della catena respiratoria con conseguente diminuzione di ATP;
- Nei vermi vecchi (giorno 8 – 10) in trattamento con Uro A, è stata invece osservata una quantità maggiore di mitocondri, superiore a quella del controllo non trattato. Questo dimostra un aumento della biogenesi mitocondriale nei vermi più anziani.

È stata studiata anche la risposta mitofagica su *C. Elegans*, già osservata in precedenza in quanto anche la restrizione calorica influisce sul prolungamento della vita. Questo perché viene ridotto il sensore di nutrienti TOR che, producendo un fenotipo autofagico, attiva l'autofagia. L'ipotesi è stata dimostrata inibendo i geni dell'autofagia che impedivano di conseguenza il prolungamento della vita (Hansen et al, 2008). Così come la restrizione calorica regola la risposta autofagica, si è visto che anche la somministrazione di Uro A agisce inducendo autofagia selettiva nel mitocondrio, ossia mitofagia. L'induzione della mitofagia in *C. Elegans* dopo somministrazione di Uro A è stata confermata e monitorata grazie ad un ceppo in grado di esprimere la proteina autofagosoma LGG1 associata a LC3II.

Sono stati studiati alcuni geni mitofagici uguali o omologhi a quelli umani per valutare più nel dettaglio l'ipotetica eliminazione mitocondriale conseguente all'assunzione di Uro A.

Bec-1 è un gene regolatore dell'autofagia, omologo di Beclin1. Silenziando Bec-1 con RNAi, un RNA che interferisce con l'espressione genica, si osserva al quinto giorno un contenuto mitocondriale più elevato nel muscolo e nell'intestino dopo somministrazione di Uro A, prova del fatto che la sua assunzione induce i geni mitofagici e quindi la mitofagia (*figura 10a 10b*).

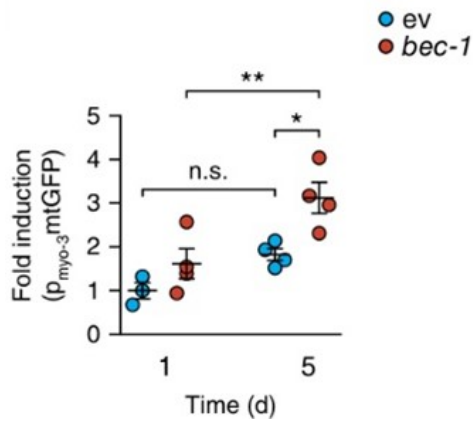


Figura 10a: Rappresentazione nel muscolo del rapporto tra il contenuto mitocondriale e il tempo di *bec-1* in *C.Elegans* rispettivamente a 1 giorno e a 5 giorni di trattamento con Urolitina A UA rispetto al veicolo di controllo. Si osserva un aumento significativo (** $P \leq 0,05$) al quinto giorno di trattamento con UA. (Ryu et al., 2016, figura 3c)

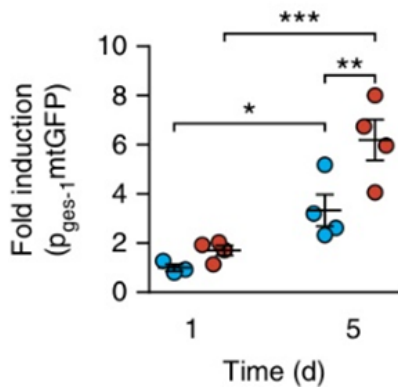


Figura 10b: Rappresentazione del rapporto tra il contenuto mitocondriale e il tempo di *bec-1* nell'intestino di *C.Elegans* rispettivamente a 1 giorno e a 5 giorni di trattamento con Urolitina A UA rispetto al veicolo di controllo. Si osserva un aumento significativo (** $P \geq 0,01$) al quinto giorno di trattamento con UA (Ryu et al., 2016, figura 3b).

Valutando la mitofagia nel breve termine in vermi knock down (silenzianti) per *bec-1*, SQST-1/p62, PTEN, PINK1 e l'omologo di BNIP3 si nota in tutti una perdita iniziale dell'eliminazione mitocondriale dopo somministrazione di Uro A, coerentemente con l'ipotesi che Uro A induca mitofagia.

L'estensione della durata della vita mediante somministrazione di Uro A in *C. Elegans* dipende quindi dalla stimolazione di biogenesi e mitofagia, due processi strettamente collegati che determinano l'equilibrio mitocondriale. Coerentemente a questa affermazione è stata osservata, dopo somministrazione di Uro A, una rete mitocondriale più frammentata sia nell'intestino che nel muscolo. I geni che regolano la biogenesi mitocondriale e l'espressione genica della mitofagia, correlati con l'allungamento della vita, sono *bec-1*, *sqst-1*, *vps-34*, *PINK1*, *skn-1* (analogo di Nrf2).

Per quanto riguarda l'attività del verme, intesa come velocità e mobilità della faringe, è stato eseguito un saggio nei vermi adulti utilizzando una versione modificata di Parallel Worm Tracker, un sistema di tracciamento automatizzato sviluppato per quantificare la locomozione di più vermi in parallelo (Ramot et al, 2008). Si osserva un suo aumento con la somministrazione di Uro A, che manteneva meglio l'organizzazione delle fibre muscolari. Dalla morfologia muscolare del verme adulto a 1 giorno e a 8 giorni si nota una miglior distribuzione nel muscolo di *C. Elegans* trattati con Uro A (**figura 11**).

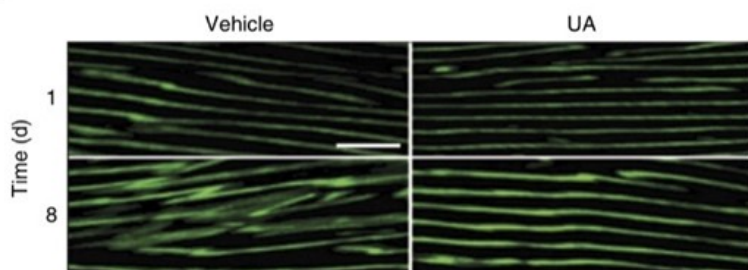


Figura 11: Rappresentazione del trattamento in *C.Elegans* con Urolitina A UA a 1 giorno e a 8 giorni rispetto al veicolo di controllo. Si osserva una struttura visivamente più ordinata e distribuita con UA (Ryu et al., 2016, figura 1h).

Sempre nello stesso studio (Ryu et al, 2016), anche in cellule mioblasti C2C12, ovvero cellule mononucleate e fusiformi derivate dal topo, si osserva una rimozione selettiva dei componenti cellulari danneggiati indotti dalla mitofagia, vista attraverso l'aumento dose dipendente dei biomarcatori mitofagici LC3II/LC3I e p62/SQSTM.

Tramite la fluorescenza Fluorence Activating Cell Sorging (FACS) è stata confermata l'induzione mitofagica mediante utilizzo di anticorpo anti-LC3II, e successivamente anche con l'utilizzo di Bafilomycin A, un inibitore dell'attività lisosomiale che ha portato nei mioblasti trattati con Uro A un aumento di p62/SQSTM e LC3II, inducendo così il flusso autofagico in 24h (*figura 12*).

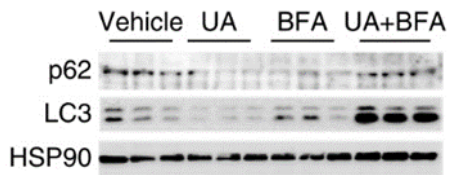


Figura 12: Le cellule C2C12 sono state trattate per 24h con UroA e/o Bafilomicina 10nM. Vengono qui rappresentati i risultati con tecnica biochimica di Western Blot (Ryu et al., 2016, figura 4c)

Il test di spettrofotometria di fluorescenza con colorante Cyto ID ha consentito, mediante colorazione FACS, la stima del flusso autofagico degli autofagosomi endogeni e degli autolisosomi, caratteristici del processo autofagico dimostrando che il trattamento con Uro A induce la formazione di autofagosmoni endogeni (*figura 13*) (Guo et al, 2015).

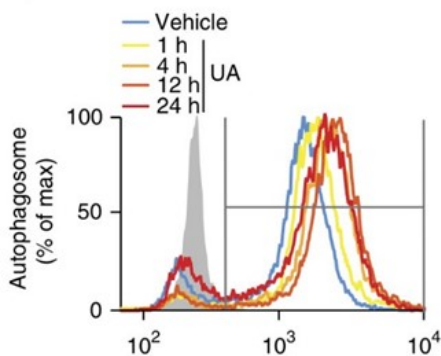


Figura 13: Rappresentazione dell'intensità di fluorescenza del colorante Cyto ID nelle cellule C2C12 mediante quantificazione con FACS. Rapporto tra la percentuale massima di autofagosomi (autophagosome % of max) sulla concentrazione di Urolitina A UA misurata al tempo: 0h (veicolo di controllo), 1h, 4h, 12h, 24h (Ryu et al., 2016, figura 4d).

La formazione di autofagosomi è stata confermata anche dalla microscopia confocale, tecnica che consente di avere immagini ad alta risoluzione nei tessuti spessi (Elliott, 2020).

Il processo mitofagico è stato osservato mediante quantificazione con tecnica FACS utilizzando pH RED un sensore di pH codificato geneticamente mediante mutazione della proteina mkeima, una proteina in grado di esprimere una fluorescenza rossa che ha permesso di osservare i cambiamenti mitocondriali. Dopo 24h dalla somministrazione di UroA si osserva, oltre alla formazione degli autofagosomi, anche un aumento significativo ($P \leq 0,001$) della percentuale di mitocondri all'interno di queste vescicole a conferma del proseguimento del processo mitofagico (**figura 14a 14b**) (Tantama et al, 2011).

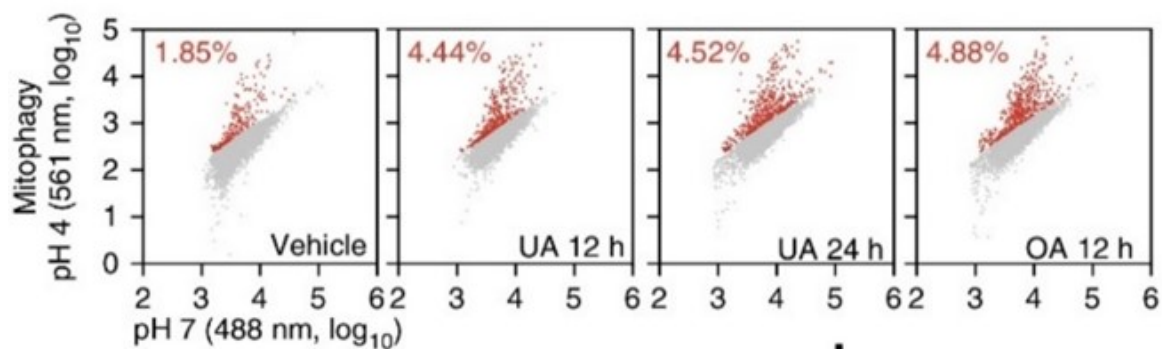


Figura 14a: Rappresentazione della fluorescenza osservata mediante sensore pH RED nelle cellule C2C12 senza trattamento (1,85%), o mediante trattamento con Urolitina A UA dopo 12h (4,44%), dopo 24h (4,52%), mediante trattamento con oligomicina+antimicina (4,88%) (Ryu et al., 2016, figura 4h).

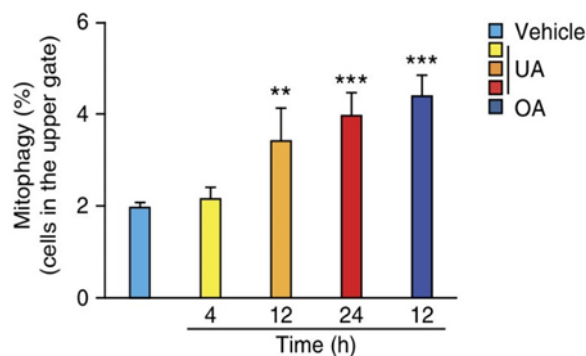


Figura 14b: quantificazione della figura 11a, rappresentata mediante istogramma del rapporto tra le cellule all'interno delle vescicole (cells in the upper gate) sul tempo delle cellule C2C12 senza trattamento, mediante trattamento con Urolitina A UA a 4h, 12h (** $P \leq 0,01$) e 24h (***) $P \leq 0,001$) e mediante trattamento con oligomicina+antimicina A a 12h (***) $P \leq 0,001$) (Ryu et al., 2016, figura 4h).

Infine, dopo il trattamento con Uro A per 24h è stata osservata (**figura 15**), attraverso la diminuzione significativa ($P \leq 0,01$) del rapporto mtDNA/nDNA, una diminuzione del 20% del contenuto mitocondriale.

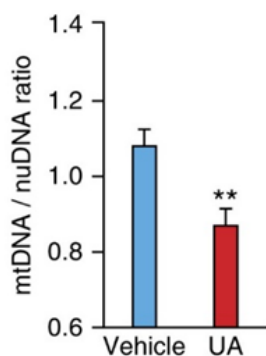


Figura 15: Rappresentazione del rapporto mtDNA/nDNA nelle cellule C2C12 con o senza trattamento con Urolitina A UA. Diminuzione significativa (** $P \leq 0,01$) di mtDNA nelle cellule trattate con UA (Ryu et al., 2016, figura 4i).

Un altro segnale che evidenzia in C2C12 l'induzione della mitofagia trattate con Uro A è la perdita del potenziale di membrana mitocondriale. La quantificazione del potenziale è resa

possibile dall'utilizzo della fluorescenza rosso-arancio del tetramethylrhodamine TMRM (*figura 16*).

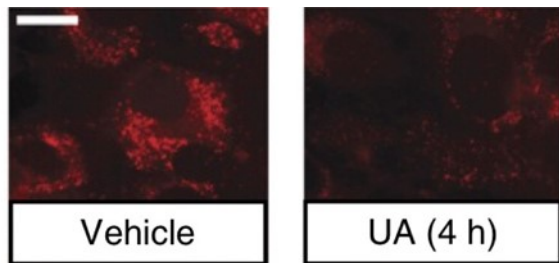


Figura 16: Rappresentazione e quantificazione della fluorescenza TMRM mediante FACS in cellule C2C12 senza trattamento (veicolo) e con trattamento Urolitina A UA 50 μ M dopo 4h (Ryu et al., 2016, figura 5a).

Per quanto riguarda la catena respiratoria mitocondriale si osserva dopo 24h una diminuzione significativa ($P \leq 0,05$) dell'enzima citrato sintasi (1° reazione del ciclo di Krebs) (*figura 17*) e del contenuto di ATP (*figura 18*).

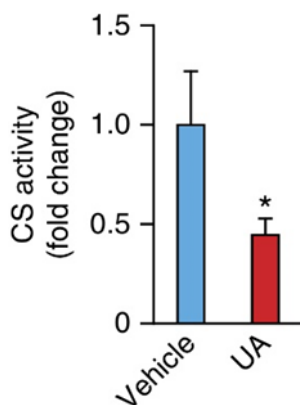


Figura 17: Rappresentazione dell'attività dell'enzima citrato sintasi CS in cellule C2C12 senza o con trattamento Urolitina A UA 50 μ M. Si osserva una diminuzione di CS dopo trattamento (* $P \leq 0,05$) (Ryu et al., 2016, figura 5f)

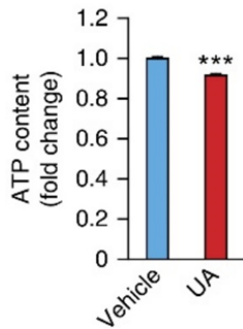


Figura 18: Rappresentazione del contenuto di ATP in cellule C2C12 con o senza trattamento Urolitina A UA 50 μ M. Si osserva una diminuzione di ATP dopo trattamento (***) $P \leq 0,001$ (Ryu et al., 2016, figura 5i).

La riduzione di ATP e citrato sintasi ha portato a misurare anche l'O₂ consumato, che è diminuito significativamente ($P \leq 0,05$) dopo trattamento con Uro A (**figura 19**).

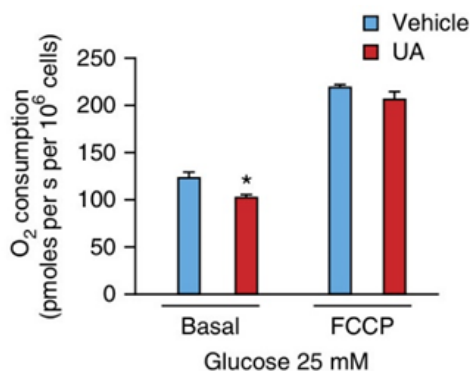


Figura 19: Rappresentazione della relazione tra ossigeno consumato (O₂ consumato) e il glucosio 25 μ M in cellule C2C12 dopo 24h. A livello basale Uro A 20 μ M ha diminuito significativamente ($* P \leq 0,05$) il consumo di ossigeno portando ad una riduzione della respirazione basale. La massima capacità respiratoria, misurata con l'aggiunta di FCCP, non ha portato a differenze significative tra le cellule di C2C12 senza trattamento e con trattamento Uro A (Ryu et al., 2016, figura 5d).

La massima capacità respiratoria, invece, è stata misurata aggiungendo carbonil p-trifluorometossifenil idrazone FCCP, un disaccoppiatore della catena respiratoria mitocondriale

mediante spostamento di protoni nella membrana interna (Benz & McLaughlin, 1983). Non sono state osservate differenze significative tra le cellule C2C12 trattate con Uro A e quelle senza trattamento. La riduzione di ATP e citrato sintasi ha quindi come conseguenza una riduzione della respirazione basale inferiore seppur mantenendo la massima capacità respiratoria.

È stato inoltre misurato il consumo di ossigeno in 24 ore nelle cellule C2C12 in mezzo glicolitico (25 μ M di glucosio) aggiungendo: piruvato 5nM / malato 2nM / glutammato 10nM / NAD⁺, succinato 10nM, rotenone 0,5 μ M o antimicina A 2,5 μ M (**figura 20**).

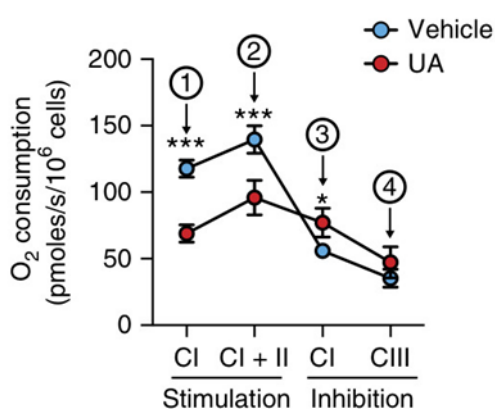


Figura 20: Mediante test T di Student delle medie, è stato confrontato l'andamento del consumo di ossigeno nelle cellule C2C12 senza Uro A e con Uro A con l'aggiunta di:

- piruvato - malato - glutammato - NAD⁺: stimolano complesso CI. Le cellule C2C12 trattate con Uro A hanno riscontrato significative diminuzioni (***) $P \leq 0,001$ della stimolazione del complesso CI;
- succinato: stimola complessi CI e CII. Le cellule C2C12 trattate con Uro A hanno riscontrato significative diminuzioni (***) $P \leq 0,001$ della stimolazione dei complessi CI e CII. Rispetto alla stimolazione del solo complesso CI si ha una minor riduzione;
- rotenone: inibisce il complesso CI. Le cellule C2C12 trattate con Uro A hanno riscontrato un aumento significativo (*) $P \leq 0,05$ dell'inibizione del complesso CI;
- antimicina A: inibisce il complesso CIII. Non sono stati osservati cambiamenti significativi tra le cellule C2C12 trattate con Uro A e il controllo (Ryu et al., 2016, figura 5g).

Dall'analisi si nota una diminuzione dell'attività complesso CI, che potrebbe essere compensata dal complesso CII, ossia utilizzando FADH₂ (cofattore di CII) invece che NADH (cofattore di CI). Per verificare l'ipotesi sono state incubate le cellule C2C12 in un mezzo che stimola l'ossidazione degli acidi grassi producendo così FADH₂. Il consumo di ossigeno è stato misurato sia sulle cellule trattate con Uro A che nelle cellule senza trattamento e tra i due sono stati riscontrati aumenti significativi (P<0,05) nelle cellule trattate con Uro A sia a livello basale che con FCCP (*figura 21*).

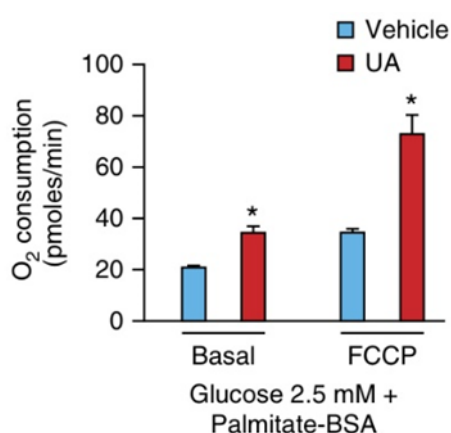


Figura 21: Rappresentazione del consumo di ossigeno nel mezzo contenente 2,5 μ M di glucosio e 166 μ M di palmitato). Il Trattamento delle cellule C2C12 con Uro A 20 μ M per 24 ore ha aumentato il consumo di O₂ rispetto alle cellule non trattate (Ryu et al., 2016, figura 5h).

Confrontando i grafici 17 e 18 si nota una differenza respiratoria legata al diverso utilizzo dei complessi CI e CII nelle cellule C2C12 trattate con Uro A. Mediante Western blot è stato inoltre riscontrato un aumento pari a circa 10 volte i livelli di espressione della subunità del complesso CII e di 4-5 volte le subunità che prendono parte alla catena respiratoria relative ai complessi CIII, CIV e CV (*figura 22*).

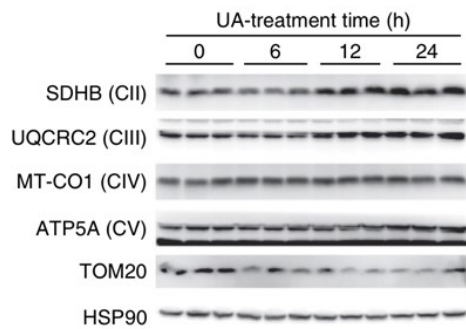


Figura 22: Rappresentazione del trattamento di Uro A mediante tecnica biochimica di Western blot sui complessi CII (SDHB), CIII (UQCRC2), CIV (MT-CO1), CV (ATP5A) a 0 – 6 – 12 – 24 ore (Ryu et al., 2016, figura 5i).

Sebbene vi sia stata una diminuzione della glicolisi aerobica, è stato riscontrato un aumento nel numero di subunità della catena mitocondriale e della quota di respirazione mediata dal complesso CII e questo spiega come le cellule tendano a rispondere nei casi di richiesta energetica laddove vi sia un ridotto contenuto mitocondriale.

Il gruppo di ricerca di Ryu et al. , ha poi condotto alcuni studi sui ratti per verificare se l'Uro A, oltre a passare il tratto gastro-intestinale e arrivare nei tessuti di fegato, reni e colon come già aveva evidenziato lo studio elaborato da Gasperotti, M. et al. nel 2015 (**figura 23**), risultasse biodisponibile anche nel tessuto muscolare scheletrico.

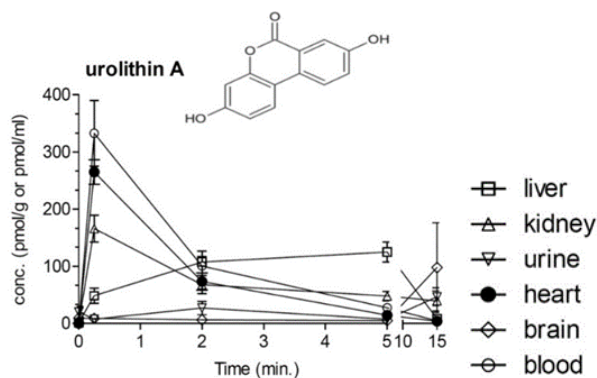


Figura 23: Rappresentazione della concentrazione di Uro A nei vari organi dei ratti nel tempo (Gasperotti et al., 2015, figura 6).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che, a seguito di una somministrazione di 25 mg/kg peso corporeo/giorno di Uro A addizionata al cibo, questa risulta biodisponibile e stabile anche nel plasma e nel muscolo vasto laterale dei ratti.

Alla luce di quanto riscontrato, è stata poi valutata la possibilità di effettuare trattamenti a base di Uro A per la prevenzione del declino muscolare legato all'età, in topi C57BL/6J di 16 mesi alimentati con una dieta ricca di grassi (high fat diet – HFD). Dopo 8 mesi, rispetto al gruppo di controllo che era stato alimentato semplicemente con HFD, il gruppo che in aggiunta aveva ricevuto una dose di 50mg/kg/giorno di Uro A, sebbene non differisse per peso corporeo guadagnato e non mostrasse differenze relative agli indici di massa grassa e magra, mostrava all'età di 22-24 mesi un notevole aumento della funzionalità muscolare. È stato registrato un aumento significativo ($P \leq 0,05$) pari al 9% della forza di presa dopo trattamento con Uro A di 27 settimane (**figura 24**) e un aumento significativo ($P \leq 0,05$) del 57% dell'esercizio spontaneo su ruota da corsa dopo trattamento con Uro A di 31 settimane (**figura 25**).

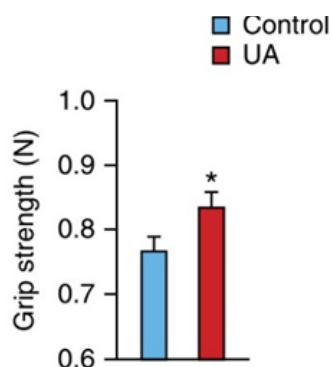


Figura 24: Rappresentazione della forza peso misurata in Newton nei topi senza trattamento (veicolo) o con trattamento Urolitina A UA. UA ha portato ad un aumento significativo ($*P \leq 0,05$) della forza peso (Ryu et al., 2016, figura 6a).

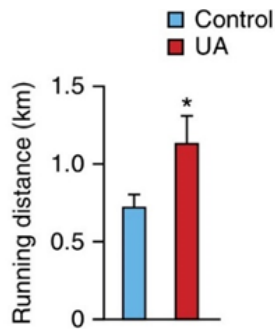


Figura 25: Rappresentazione della distanza percorsa misurata su Km di percorso dei topi nelle ruote durante la notte senza trattamento (veicolo) o con trattamento Urolitina A UA. UA ha portato ad un aumento significativo (* $P < 0,05$) dei Km di corsa (Ryu et al., 2016, figura 6b).

Al fine di escludere che vi potesse essere una qualche influenza sugli effetti dell'integrazione di Uro A legata alla tipologia di dieta, è stato poi condotto uno studio di 6 settimane, simile al precedente, ma questa volta su topi C57BL/6J anziani (22,5 mesi di età) a cui è stata imposta una dieta normale (normal chow diet – NDC) e anche in questo caso peso e composizione corporea non differivano tra il gruppo che aveva ricevuto la supplementazione di Uro A e quello di controllo, ma si è osservato un aumento medio significativo ($P \leq 0,001$) del 42% della resistenza alla corsa (**figura 26a 26b**).

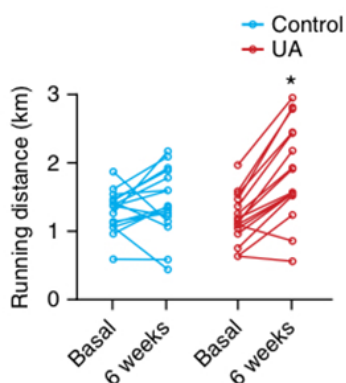


Figura 26a: Rappresentazione della distanza di corsa in Km in topi C57BL/6J senza trattamento (veicolo) o con trattamento Urolitina A UA. Km misurati sia nella corsa basale che dopo 6 mesi mostrando un aumento significativo con UA (* $P < 0,05$) (Ryu et al., 2016, figura 6c).

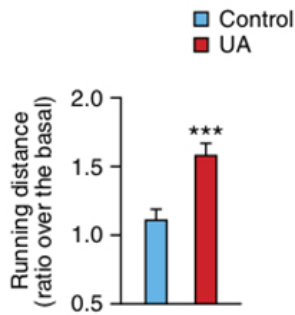


Figura 26b: Rappresentazione del rapporto rispetto al basale della corsa in topi C57BL/6J senza trattamento (controllo) o con trattamento Urolitina A UA. UA ha indotto un aumento significativo (***) $P \leq 0,001$ della distanza di corsa al basale nei topi con trattamento (Ryu et al., 2016, figura 6d).

Tali risultati suggeriscono che l'Uro A vada a migliorare la qualità cellulare piuttosto che aumentarne il numero ed indicano inoltre che gli effetti di Uro A sulla funzionalità muscolare sono indipendenti dal tipo di dieta seguita dal soggetto trattato.

Sulla base di queste osservazioni è stato infine studiato l'effetto che Uro A induce sulla funzionalità muscolare di giovani ratti Wistar (5,5 settimane di età o più), dopo trattamento con 25 mg/kg peso corporeo/giorno di Uro A per 6 settimane. I giovani ratti sono stati randomizzati secondo il loro livello di attività e, a partire dalla loro settima settimana di vita hanno avuto accesso libero due notti a settimana alla corsa volontaria su ruota.

Da questo studio è emerso che i topi trattati con Uro A avevano una capacità di corsa del 65% maggiore rispetto al gruppo di controllo (aumento significativo $P < 0,01$) (**figura 27**).

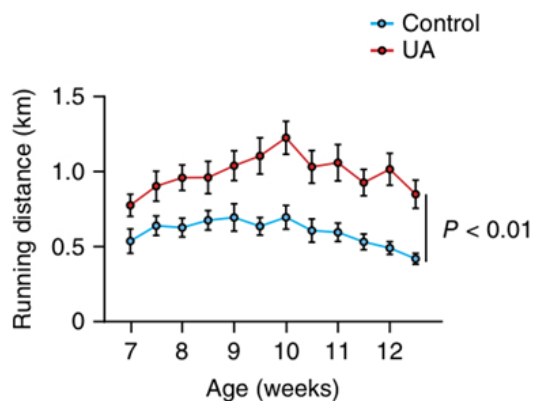


Figura 27: Rappresentazione della distanza percorsa in km sulle settimane di età dei topi. Test ANOVA bidirezionale mostra una distanza percorsa maggiore nei ratti trattati con Uro A rispetto a quelli non trattati. Uro A aumenta del 65% la capacità di corsa (Ryu et al., 2016, figura 6d).

Gli stessi ratti sono stati poi studiati a livello molecolare confermando anche qui l'induzione di biogenesi mitocondriale e mitofagia:

- Stimolazione della mitofagia del muscolo gastrocnemio data dall'aumento significativo ($P < 0,05$) del rapporto LC3II:LC3I e dalla diminuzione di p62/SQSTM1;
- Stimolazione della biogenesi mitocondriale data dall'induzione della fosforilazione di AMPK aumentata significativamente ($P < 0,05$) nel tessuto muscolare (**figura 28a e 28b**).

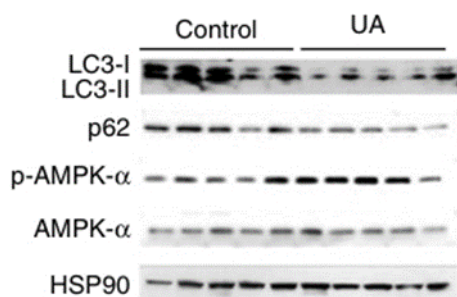


Figura 28a: Rappresentazione dei geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale e la mitofagia mediante Western Blot in ratti Wistar trattati o non trattati con Uro A (Ryu et al., 2016, figura 6e).

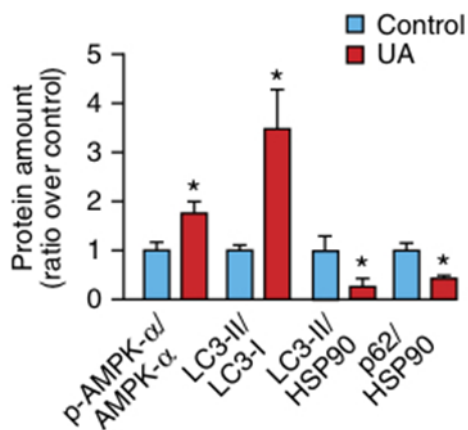


Figura 28b: Quantificazione di AMPK, LC3II, LC3I, p62 mediante test ANOVA bidirezionale tra ratti Wistar non trattati con Uro A e ratti Wistar trattati con Uro A. Tutti e 4 evidenziano un aumento significativo ($* P < 0,05$) a seguito del trattamento (Ryu et al., 2016, figura 5e).

Per quanto riguarda la catena respiratoria anche qui, come nei vermi *C. Elegans* e nelle cellule C2C12, è stato osservato un aumento dell'attività del complesso CII e una riduzione dell'attività del complesso CI (**figura 29**).

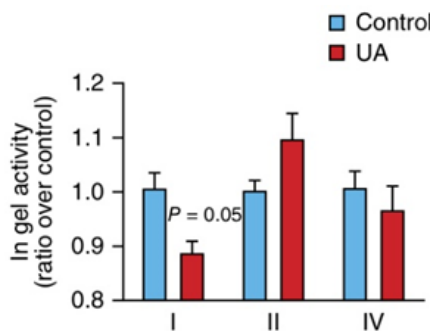


Figura 29: Rappresentazione dell'attività in gel dei complessi CI, CII e CIV nei topi Wistar con o senza trattamento con Uro A. Si osservano riduzioni significative ($P=0,05$) del complesso CI nei ratti trattati con Uro A rispetto al controllo (Ryu et al., 2016, figura 6h).

4.3 GLI STUDI IN UMANO

La capacità dell'Uro A di migliorare la funzionalità muscolare negli animali in vitro e in vivo ha reso questa sostanza oggetto di studio anche in umano.

Il primo studio clinico sull'uomo è stato eseguito in doppio cieco controllato con placebo su anziani sani e sedentari. Uro A è stata somministrata a dosi di 500 mg – 1000 mg, concentrazioni per le quali è possibile osservare un effetto anche nel breve termine (28 giorni), per valutare l'impatto sulla funzionalità mitocondriale e muscolare.

A livello plasmatico si osserva, dopo somministrazione di Uro A 500 mg e 1000 mg, una riduzione significativa ($P < 0,05$) delle acilcarnitine, coinvolte nel processo di ossidazione degli acidi grassi (**figura 30**).

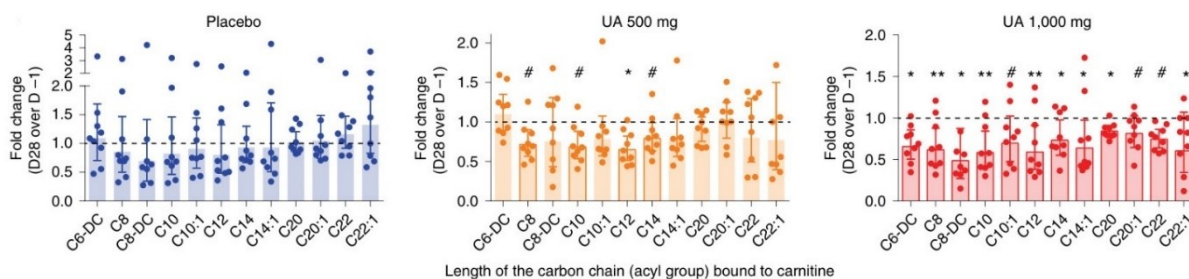


Figura 30: Rappresentazione dei livelli plasmatici di acilcarnitine disposti in base alla lunghezza della catena carboniosa del gruppo acilico legata alla carnitina. I valori si riferiscono alla media geometrica con intervallo di confidenza 95% e sono stati ricavati dopo 28 giorni dalla somministrazione di placebo, Uro A 500 mg o Uro A 1000 mg in 9 campioni biologicamente indipendenti. L'analisi ANOVA a due vie evidenzia una diminuzione dei livelli con P value compreso tra $0,05 < P < 0,15$ (#), $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**). Le variazioni risultano più marcate dopo somministrazione di Uro A 1000 mg, dopo quella di Uro A 500 mg si osservano variazioni in C8, C10, C12 e C14, ovvero le specie a catena corta (Andreux et al., 2019, figura 1c).

La riduzione risulta particolarmente importante nelle acilcarnitine a catena corta che, essendo intermedie dell'ossidazione, indicano una migliore efficienza del processo catalitico. Le acilcarnitine risultano inversamente correlate alla funzione mitocondriale e muscolare poiché

la loro riduzione migliora il processo di ossidazione degli acidi grassi, importante fonte di energia nel muscolo scheletrico (Andreux et al, 2019) (Ranallo et al, 1998).

La diminuzione dei livelli plasmatici di acilcarnitine (**figura 31**) è stata osservata anche in campioni di plasma relativi ad uno studio di 66 persone con età media di 71,7 anni \pm 4,94, dopo 2 e 4 mesi di somministrazione di Uro A 1000 mg. La diminuzione significativa delle acilcarnitine rispetto al placebo conferma ulteriormente il miglioramento della salute mitocondriale apportata da Uro A (Liu et al, 2022).

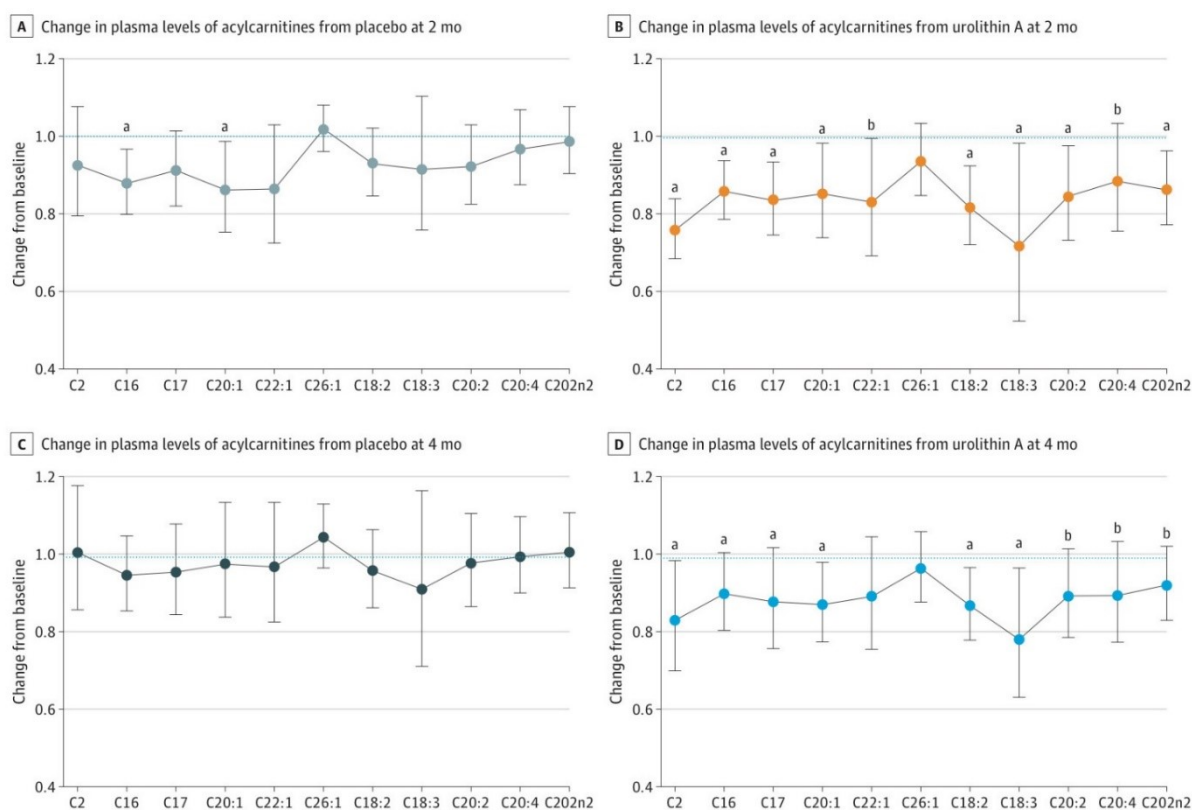


Figura 31: Rappresentazione dei livelli plasmatici di acilcarnitine disposti in base alla lunghezza della catena carboniosa del gruppo acilico legata alla carnitina. I valori si riferiscono alla media geometrica con intervallo di confidenza 95% e sono stati ricavati dopo 2 mesi (A – B) o dopo 4 mesi (C – D) dalla somministrazione di placebo o Uro A 1000 mg. L’analisi ANOVA a due vie evidenzia una diminuzione dei livelli rispetto al basale con P value compreso tra $0,05 < P < 0,10$ (b) e $P < 0,05$ (a) (Liu et al., 2022, figura 3a 3b 3c 3d).

A livello molecolare, nel primo studio in umano era stata valutata anche l'espressione genica nel vasto laterale (muscolo scheletrico) mediante test diagnostico quantitativo qPCR dopo somministrazione di 500 mg e 1000 mg di Uro A per 28 giorni (**figura 32**). Il test ha dimostrato una sovraregolazione dei geni mitocondriali, in particolare per quanto riguarda i geni relativi alla mitofagia, alla biogenesi mitocondriale e all'ossidazione degli acidi grassi. Valori significativi si osservano per il gene GABARAPL1, coinvolto nella mitofagia, e per FABP3, proteina di trasporto degli acidi grassi (Andreux et al, 2019).

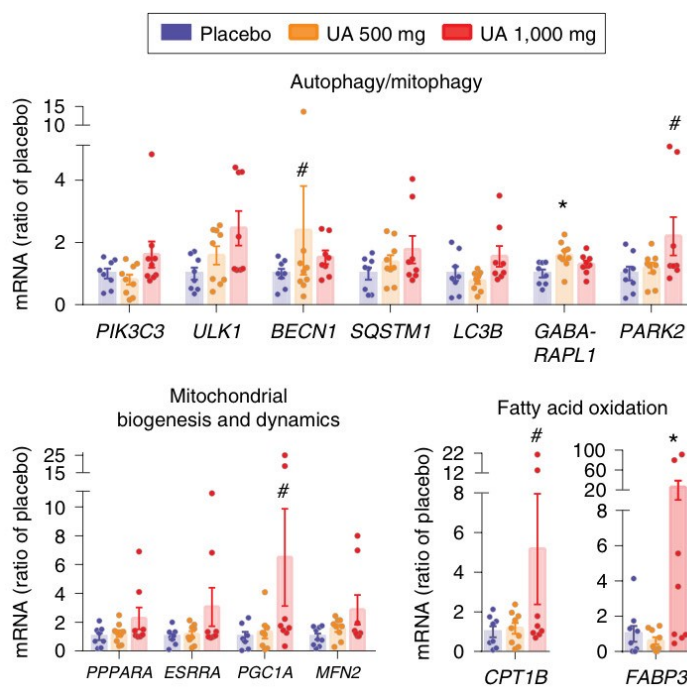


Figura 32: Rappresentazione dei livelli di mRNA, misurati mediante qPCR, riguardanti autofagia/mitofagia, biogenesi mitocondriale e ossidazione degli acidi grassi dopo somministrazione di placebo, Uro A 500 mg o Uro A 1000 mg per 28 giorni in 9 campioni biologicamente indipendenti. Dal confronto delle medie \pm sem dell'mRNA tra placebo e la somministrazione di Uro A, effettuato mediante ANOVA unidirezionale, si osserva un aumento con P value $0,05 < P < 0,15$ (#) di BECN1 a 500mg e di PARK2 MFN2 e CPT1B a 1000 mg. In particolare si riscontrano aumenti significativi ($P < 0,05$) per quanto riguarda GABARAPL1 a 500 mg e FABP3 a 1000 mg (Andreux et al., 2019, figura 2a).

La risposta mitocondriale generata dopo la somministrazione di Uro A nel vasto laterale è stata confermata dai dati ottenuti dall'analisi dell'espressione dell'RNA effettuata con Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Questo metodo analitico si concentra su un gruppo di geni che condividono la stessa funzione biologica, la stessa posizione cromosomica o la stessa regolazione. Sono stati rilevati cambiamenti dell'espressione genica con somministrazione di Uro A dopo 28 giorni sia a 500 mg che a 1000 mg, individuando una sovraregolazione di alcuni geni mitocondriali (**figura 33**) in particolare i geni GO-MITOCHONDRION. Il numero di risultati falsi positivi sul totale di positivi, calcolata con False Discovery Rate (FDR - differenza del tasso di falsi positivi) è risultata FDR < 0,043 in Uro A 500 mg e FDR < 0,01 in Uro A 1000 mg, confermando ulteriormente la sovra espressione mitocondriale (Andreux et al, 2019).

Table 1 | List of mitochondrial gene sets that are enriched in human skeletal muscle after 28 d of UA administration

Gene sets	Number of genes per gene set	500 mg change over time normalized over placebo		1,000 mg change over time normalized over placebo	
		NES	FDR	NES	FDR
GO_MITOCHONDRIAL_ENVELOPE	691	NA	NA	1.762903	0.0387385
GO_MITOCHONDRIAL_MATRIX	412	2.525320	0.0020414	1.987229	0.0069189
GO_MITOCHONDRIAL_PART	953	2.078387	0.0751073	2.090689	0.0021444
GO_MITOCHONDRION	1,633	2.192505	0.0432333	1.939153	0.0102209
GO_MITOCHONDRION_ORGANIZATION	594	NA	NA	1.757141	0.0398731
GO_INNER_MITOCHONDRIAL_MEMBRANE_PROTEIN_COMPLEX	106	NA	NA	1.639517	0.0855748
GO_MITOCHONDRIAL_MEMBRANE_PART	173	NA	NA	1.697246	0.0621488
GO_MITOCHONDRIAL_PROTEIN_COMPLEX	136	NA	NA	1.668623	0.0728421

NES, normalized enrichment score; FDR, the estimated probability that a gene set with a given enrichment score (normalized for gene set size) represents a false positive finding; NA, not available (no significant enrichment).

Figura 33: Lista dei set di geni mitocondriali arricchiti nel muscolo scheletrico dopo 28 giorni di somministrazione di Uro A alle dosi di 500 mg e 1000 mg. È stato presentato il numero di geni per set genico e la loro variazione nel tempo in base alla concentrazione di Uro A a confronto con il placebo. È stato riportato il punteggio di arricchimento normalizzato (Normalized Enrichment Score - NES) e la stima della probabilità che un set di geni con un dato NES rappresenti un risultato falso positivo. NA = nessun arricchimento positivo. GO = Gene Ontology. A 500 mg di Uro A si osservano arricchimenti dei set genici GO_MITOCHONDRIAL_MATRIX, GO_MITOCHONDRIAL_PART, GO_MITOCHONDRION. A 1000 mg di Uro A le variazioni rispetto al placebo si sono osservate in tutti i set (Andreux et al., 2019, tabella 1).

Un precedente studio ha valutato la funzionalità mitocondriale di soggetti anziani attivi confrontandola con quella di soggetti anziani fragili di età superiore ai 60 anni ed è stato dimostrato che, nei soggetti fragili, i geni mitocondriali sono significativamente sotto regolati (Andreux et al, 2018). Confrontando questo studio con lo studio di Andreux et al. sull'Uro A si osserva, dopo somministrazione di Uro A 1000 mg per 28 giorni, una sopra espressione dei geni mitocondriali fornendo sostanziali vantaggi nella salute mitocondriale dell'anziano e nel declino correlato all'età (**Figura 34**) (Andreux et al, 2019).

Table 2 | List of gene sets that are enriched in human skeletal muscle after 28 d of UA administration at 1,000 mg and downregulated in human skeletal muscle of pre-frail compared to active elderly subjects (NIS; NCT02472340)

Gene sets	Number of genes per gene set	Downregulated in pre-frail compared to active elderly (NIS; NCT02472340)		1,000 mg change over time normalized over placebo	
		NES	FDR	NES	FDR
GO_GENERATION_OF_PRECURSOR_METABOLITES_AND_ENERGY	292	-3.0632	<1×10 ⁻⁶	2.144	0.0011
GO_MITOCHONDRIAL_PART	953	-3.4394	<1×10 ⁻⁶	2.0907	0.0021
GO_MITOCHONDRIAL_MATRIX	412	-3.4099	<1×10 ⁻⁶	1.9872	0.0069
GO_ENERGY_DERIVATION_BY_OXIDATION_OF_ORGANIC_COMPOUNDS	217	-3.2779	<1×10 ⁻⁶	1.9484	0.0096
GO_MITOCHONDRION	1,633	-3.0257	<1×10 ⁻⁶	1.9392	0.0102
GO_ORGANELLE_INNER_MEMBRANE	525	-3.5479	<1×10 ⁻⁶	1.9058	0.0136
GO_MITOCHONDRIAL_ENVELOPE	691	-3.3754	<1×10 ⁻⁶	1.7629	0.0387
GO_MITOCHONDRION_ORGANIZATION	594	-2.6828	<1×10 ⁻⁶	1.7571	0.0399
GO_CELLULAR_PROTEIN_COMPLEX_DISASSEMBLY	122	-2.7963	<1×10 ⁻⁶	1.7302	0.0494
GO_MITOCHONDRIAL_MEMBRANE_PART	173	-3.6959	<1×10 ⁻⁶	1.6972	0.0621
GO_MITOCHONDRIAL_PROTEIN_COMPLEX	136	-3.6668	<1×10 ⁻⁶	1.6686	0.0728
GO_INNER_MITOCHONDRIAL_MEMBRANE_PROTEIN_COMPLEX	106	-3.55	<1×10 ⁻⁶	1.6395	0.0856
GO_CELLULAR_RESPIRATION	143	-3.81365	<1×10 ⁻⁶	1.6263	0.0924
GO_LYASE_ACTIVITY	179	-1.6667	0.0962	1.7771	0.0352
GO_ALPHA_AMINO_ACID_CATABOLIC_PROCESS	95	-1.8396	0.0357	1.6945	0.0621
GO_ORGANIC_ACID_METABOLIC_PROCESS	953	-1.847	0.034	1.6783	0.0686

Figura 34: Lista dei set di geni mitocondriali nel muscolo scheletrico:

- negli anziani fragili rispetto agli anziani attivi
- dopo 28 giorni di somministrazione di Uro A 1000 mg rispetto al controllo.

È stato presentato il numero di geni per set genico e riportato il punteggio di arricchimento normalizzato (Normalized Enrichment Score - NES) e la stima della probabilità che un set di geni con un dato NES rappresenti un risultato falso positivo. Mettendo a confronto i due studi si osserva una sottoregolazione dei geni mitocondriali nei soggetti fragili rispetto agli attivi ed una sovraregolazione dopo somministrazione di Uro A. Uro A induce un miglioramento sistemico della salute mitocondriale simile a quello osservato come conseguenza di un regime di esercizio fisico regolare (Andreux et al., 2019, tabella 2).

Un'ulteriore conferma proviene da uno studio clinico randomizzato in doppio cieco nel quale, dall'analisi di arricchimento genico (GSEA), sono stati identificati percorsi genici correlati ai mitocondri, alla traslazione ribosomiale e alla contrazione muscolare dopo somministrazione di Uro A 500 mg, sebbene gli stessi valori non siano stati significativi a concentrazioni di Uro A 1000 mg (**Figura 35**) (Singh et al, 2022).

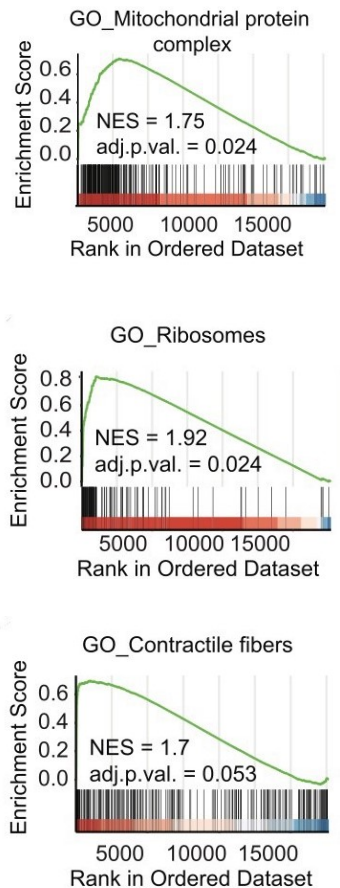


Figura 35: Rappresentazione grafica GSEA dei percorsi genici (GO gene Ontology) più significativi ($p \leq 0,05$) individuati dopo somministrazione di Uro A 500 mg in relazione al loro arricchimento genico (Enrichment Score). Viene riportato il punteggio di arricchimento normalizzato NES e il rispettivo p.value per ogni set genico:

- *GO_MITOCHONDRIAL protein complex: funzione mitocondriale NES 1,75, $p=0,024$*
- *GO_RIBOSOMES: traslazione ribosomiale NES 1,92, $p=0,024$*
- *GO_CONTRACTILE FIBERS: contrazione muscolare NES 1,7, $p=0,053$*

(Singh et al., 2022, figura 4b 4c 4d).

Inoltre, dall'analisi proteomica effettuata dopo somministrazione di Uro A 500 mg per 4 mesi rispetto al basale in persone di mezza età (tra i 40 e i 64 anni di età), il percorso mediato dalla proteina Parkin risulta significativamente arricchito ($P < 0,01$) (**Figura 36**). La proteina contiene enzimi coniuganti l'ubiquitina e componenti proteasomiali essenziali per la degradazione mediata da Parkin dei mitocondri disfunzionali nel processo mitofagico (Singh et al, 2022).

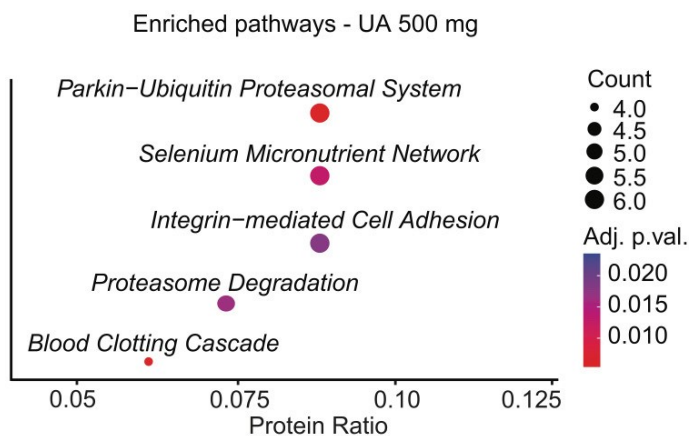


Figura 36: Rappresentazione dell'analisi di arricchimento, dopo somministrazione di Uro A 500 mg, dei percorsi più significativi mediante grafico a punti. Viene presentato il conteggio proteico mediante la dimensione del punto e il rispettivo p value in base al colore. Parkin-Ubiquitin Proteasomal System risulta essere significativamente ($p < 0,01$) arricchito (dimensione 5.5) con Uro A rispetto al placebo (Singh et al., 2022, figura 5b).

Anche a concentrazioni di Uro A 1000 mg si osserva un miglioramento a livello mitocondriale con percorsi significativamente arricchiti rispetto al basale del ciclo dell'acido tricarbossilico, dell'ossidazione degli acidi grassi e della catena di trasporto degli elettroni (**figura 37**) (Singh et al, 2022).

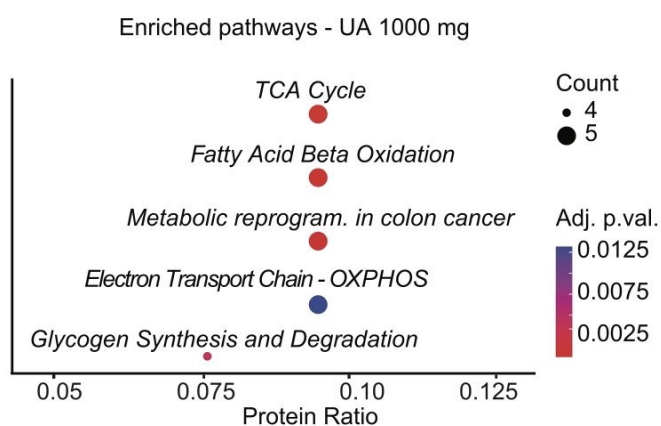


Figura 37: Rappresentazione dell'analisi di arricchimento, dopo somministrazione di Uro A 1000 mg, dei percorsi più significativi mediante grafico a punti. Viene presentato il conteggio proteico mediante la dimensione del punto e il rispettivo p value in base al colore. I set genici relativi al ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA Cycle), all'ossidazione degli acidi grassi (Fatty Acid Beta Oxidation) e alla fosforilazione ossidativa (OXPHOS) risultano essere significativamente ($p \leq 0,01$) arricchiti (dimensione 5) con Uro A (dimensioni 5.5) rispetto al placebo (Singh et al., 2022, figura 5c).

Per approfondire tali aspetti è stata utilizzata la tecnica biochimica Western blot per individuare determinate proteine all'interno del proteoma ed è stato visto che, dopo somministrazione di Uro A 500 mg e 1000 mg, sono aumentati i livelli di fosfo Parkin ed è aumentata la frazione Parkin traslocata sui mitocondri e la frazione Parkin fosforilata da PINK1 evidenziando così l'attivazione della mitofagia nel muscolo scheletrico mediata da PINK1/Parkin (**Figura 38**) (Singh et al, 2022).

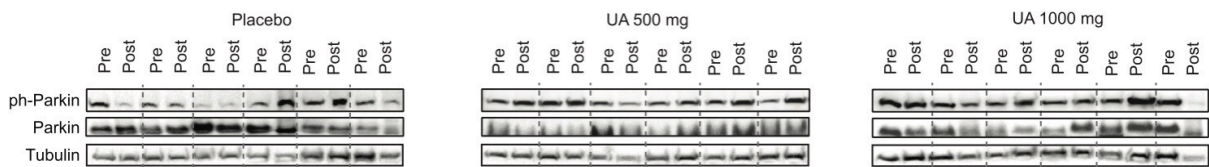


Figura 38: Rappresentazione dell'analisi di Western Blot delle biopsie del muscolo scheletrico umano del vasto laterale dei geni pH-Parkin Parkin in 6 soggetti indipendenti dopo somministrazione di Uro A 500 mg, 1000 mg o placebo. Viene riportato il pre e post somministrazione. La tubulina (tubulin) è stata utilizzata come conferma di omogeneità del gel. Si osserva un aumento dei geni dopo somministrazione di Uro A (Singh et al., 2022, figura 5d).

Inoltre, in linea con gli altri studi, è stato osservato un aumento del rapporto mtDNA/nDNA dato dall'attivazione della biogenesi mitocondriale che aumenta il contenuto mitocondriale rispetto a quello nucleare (Singh et al, 2022).

A livello muscolare, recenti studi, spinti dal successo avuto dall'Uro A nel migliorare la forza e la resistenza muscolare nei ratti Wistar e nei topi C57BL/6J (Ryu et al, 2016) hanno valutato la sua potenziale funzionalità muscolare in umano.

In uno studio randomizzato in doppio cieco in adulti di età compresa tra i 65 e i 90 anni è stata somministrata Uro A 1000 mg a 33 partecipanti e placebo agli altrettanti soggetti facenti parte del gruppo di controllo. È stata osservata la resistenza muscolare intesa come la capacità di mantenere ripetute contrazioni volontarie al 70% della massima contrazione volontaria nel primo interosseo dorsale della mano (First Dorsal Interosseus - FDI) e nel tibiale anteriore della gamba (TA).

Il Test di Fatica effettuato per valutare la resistenza si concentra quindi solo nel muscolo scheletrico, isolando effetti confondenti legati alla funzione cardiovascolare e polmonare. I dati osservati al basale, a 2 mesi e a 4 mesi dimostrano un aumento significativo della resistenza rispetto al basale sia nei muscoli delle mani che nei muscoli delle gambe. Ciò dimostra che, in assenza di allenamento fisico, l'effetto dell'Uro A sul muscolo scheletrico è confermato e tende a migliorare le prestazioni muscolari (**Figura 39, figura 40, figura 41, figura 42**) (Liu et al, 2022).

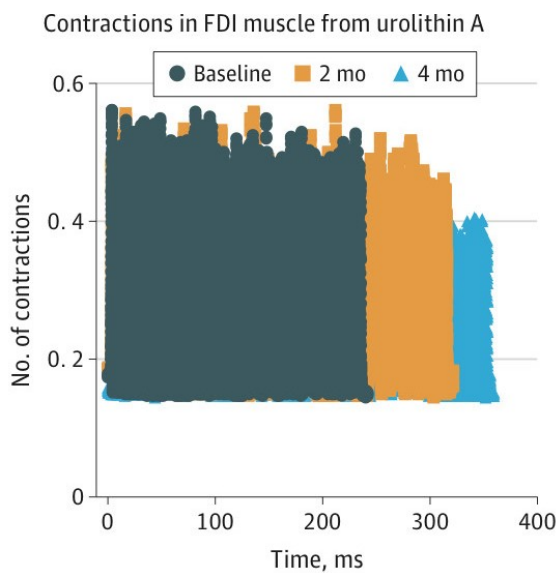
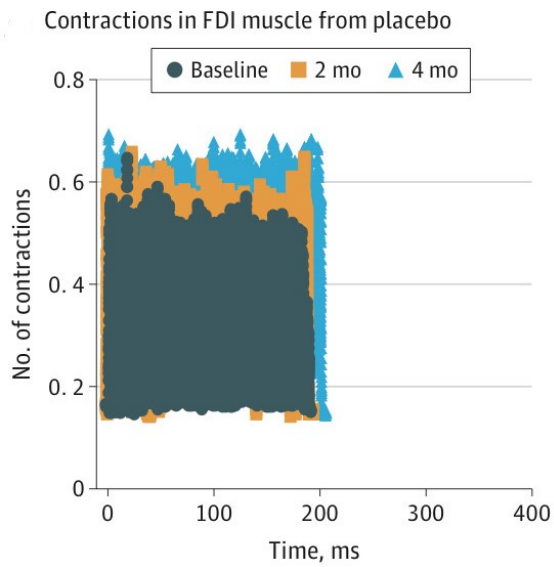


Figura 39: Rappresentazione grafica delle contrazioni in FDI al basale, dopo 2 mesi e 4 mesi:

- Con placebo;
- Con somministrazione di Uro A.

Si evidenzia una contrazione più prolungata nel tempo dopo somministrazione di Uro A che si protrae per più di 300ms sia dopo 2 mesi che dopo 4 mesi

(Liu et al., 2022, figura 2d 2e).

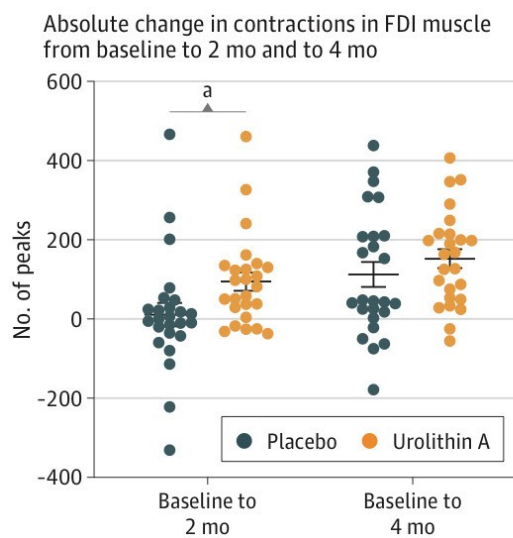


Figura 40: Rappresentazione grafica della variazione assoluta nel FDI a confronto tra placebo e Uro A. Si osserva dalla media un aumento del numero di picchi:

- Dal basale a 2 mesi ($\alpha: P < 0,01$);
- Dal basale a 4 mesi.

I dati sono stati analizzati utilizzando un'analisi di covarianza con intervallo di confidenza IC 95%.

(Liu et al., 2022, figura 2f)

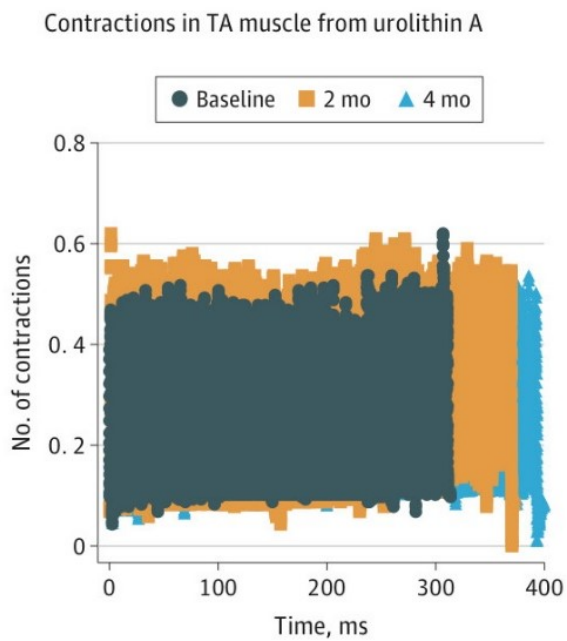
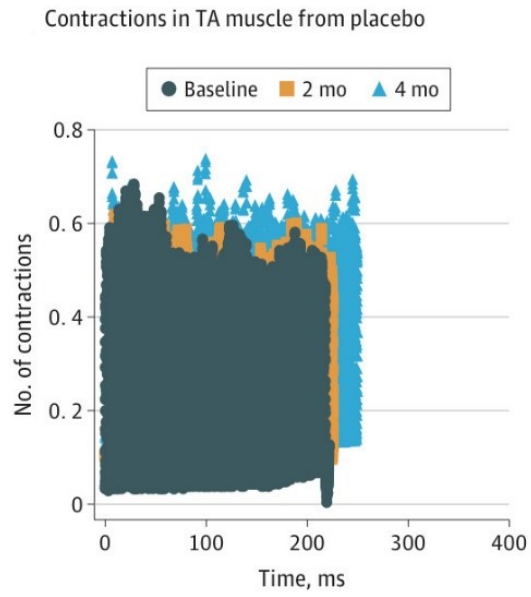


Figura 41: Rappresentazione grafica delle contrazioni nel TA al basale, dopo 2 mesi e 4 mesi:

- Con placebo;
- Con somministrazione di Uro A.

Si evidenzia una contrazione più prolungata nel tempo dopo somministrazione di Uro A.

(Liu et al., 2022, figura 2g 2h)

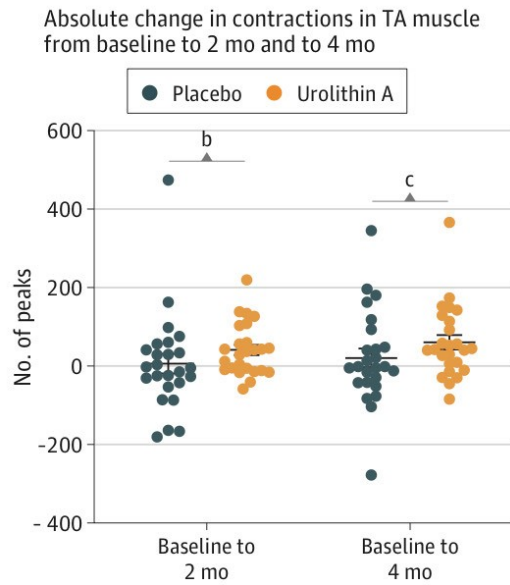


Figura 42: Rappresentazione grafica della variazione assoluta nel muscolo TA a confronto tra placebo e Uro A. Si osserva dalla media un aumento del numero di picchi:

- Dal basale a 2 mesi ($b: P = 0,05$);
- Dal basale a 4 mesi ($c: P = 0,07$).

I dati sono stati analizzati utilizzando un'analisi di covarianza con intervallo di confidenza IC 95%. (Liu et al., 2022, figura 2i)

Lo studio randomizzato in doppio cieco pubblicato su Cell Reports Medicine, basandosi sui risultati dell’Uro A nel miglioramento della resistenza muscolare, ha valutato le prestazioni muscolari e fisiche dopo somministrazione di Uro A per 4 mesi in 88 persone tra i 40 e i 64 anni. Partendo da un totale di 253 partecipanti, le 88 persone prendenti parte allo studio sono state scelte mediante criteri di inclusione ed esclusione e sono state randomizzate in 3 gruppi nella quale è stato somministrato placebo, Uro A 500 mg o Uro A 1000 mg (**figura 43**) (Singh et al, 2022).

Population demographic characteristics: ITT population				
	Placebo (n = 29)	500 mg UA (n = 29)	1,000 mg UA (n = 30)	Between group p value*
Age (years) (mean ± SD)	54.38 ± 6.42	51.03 ± 7.16	52.07 ± 5.56	0.132
Gender (n [%])				0.756
Female (%)	20 (69.00)	18 (62.10)	18 (60)	
Male (%)	9 (31.00)	11 (37.90)	12 (40)	
Weight (kg)	81.69 ± 9.44	82.93 ± 12.09	81.52 ± 11.45	0.868
Ethnicity	Western European White (n = 21; 70%); others (n = 8; 30%)	Western European White (n = 23; 79.3%); others (n = 6; 20.7%)	Western European White (n = 22; 75.9%); others (n = 8; 20.7%)	0.696
BMI (kg/m ²) (>25 kg/m ²)	29.30 ± 2.55	29.52 ± 2.82	28.91 ± 2.89	0.667
Systolic blood pressure (mmHg) (mean ± SD)	123.71 ± 11.92	124.78 ± 11.40	125.52 ± 10.24	0.824
Diastolic blood pressure (mmHg) (mean ± SD)	79.03 ± 8.68	78.41 ± 6.92	80.10 ± 7.25	0.694
Heart rate (bpm) (mean ± SD)	65.74 ± 9.61	67.60 ± 7.24	67.92 ± 8.56	0.575
V _{O2max} (mL/kg/min)	23.09 ± 4.76	23.94 ± 4.80	23.27 ± 5.92	0.806

Figura 43: Rappresentazione mediante tabella dei dati relativi agli 88 partecipanti inclusi nello studio che sono stati a loro volta randomizzati in 3 gruppi nei quali è stato somministrato: placebo, Uro A 500 mg o Uro A 1000 mg. I gruppi risultano equilibrati ($P > 0,05$) presentando dati simili legati all’età, sesso e caratteristiche fisiche. Prima della somministrazione ad ogni gruppo è stato misurato: indice di massa corporea, pressione arteriosa sistolica e diastolica, frequenza cardiaca e VO₂max (Singh et al., 2022, tabella 1).

La forza muscolare nelle gambe è stata misurata, mediante l'utilizzo di un dinamometro isocinetico, al basale e a fine studio ed è stato osservato dopo somministrazione di Uro A alle concentrazioni di 500 mg e 1000 mg, un aumento significativo sia nella coppia di picco media dei muscoli del bicipite femorale che durante la flessione del ginocchio (*figura 44, figura 45*) (Singh et al, 2022).

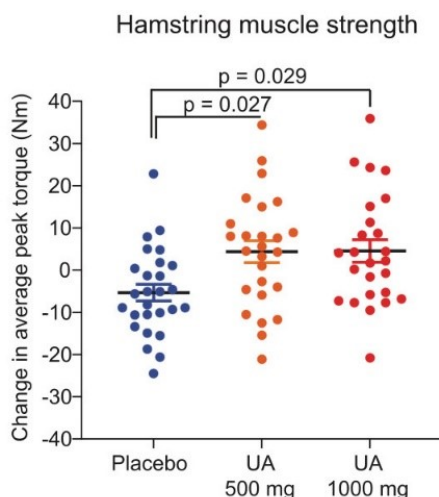


Figura 44: Rappresentazione della variazione della coppia di picco media in Nm nella forza muscolare del bicipite femorale dopo somministrazione di: placebo, Uro A 500mg o Uro A 1000 mg. La valutazione è stata fatta mediante dinamometro Biodex al basale e a fine studio. Dal test di forza isocinetica si evidenziano differenze significative tra il placebo e la somministrazione di Uro A. L'aumento è risultato significativo sia con Uro A 500 mg ($P = 0,027$) che ha aumentato la forza del muscolo del 12% e sia con Uro A 1000 mg ($P = 0,029$) che ha portato ad un aumento di forza nel muscolo pari al 9,8% (Liu et al., 2022, figura 2a).

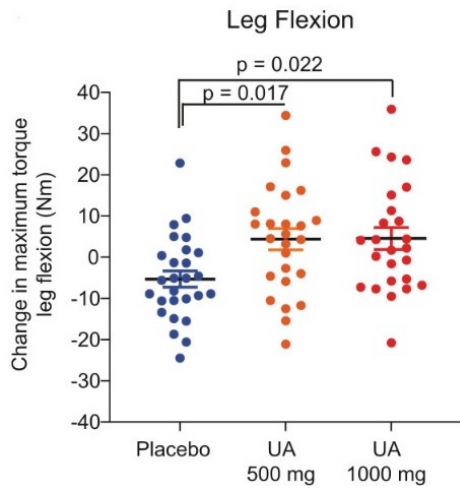


Figura 45: Rappresentazione della torsione massima in Nm durante la flessione del ginocchio dopo somministrazione di: placebo, Uro A 500mg o Uro A 1000 mg. La valutazione è stata fatta mediante dinamometro Biodex al basale e a fine studio. Dal test di forza isocinetica si evidenziano differenze significative tra il placebo e la somministrazione di Uro A. L'aumento è risultato significativo sia con Uro A 500 mg ($P = 0,017$) che ha aumentato la forza del muscolo del 10,6% e sia con Uro A 1000 mg ($P = 0,022$) che ha portato ad un aumento del 10,5% (Singh et al., 2022, figura 2b).

CAPITOLO 5: CONCLUSIONE

Questo studio di ricerca bibliografica origina dalla volontà di raccogliere le nuove evidenze presenti in letteratura riguardo l'Urolitina A e gli effetti positivi che questo composto potrebbe avere sulla funzionalità mitocondriale nel tessuto muscolare scheletrico.

L'attività mitocondriale, correlata all'invecchiamento, risulta essenziale per molte funzioni vitali, in particolare per soddisfare le richieste energetiche del muscolo scheletrico. La disfunzione mitocondriale appare come un segno distintivo dell'invecchiamento in quanto, diminuendo la produzione di energia, non risulta più sufficiente per sostenere le normali funzionalità cellulari. L'importanza nel mantenere una rete mitocondriale sana durante l'invecchiamento, limitando la perdita di omeostasi mitocondriale, risulta in linea con i dati relativi agli studi effettuati nel muscolo scheletrico sull' Uro A.

A fronte di quanto analizzato negli studi selezionati, coerentemente con l'ipotesi di partenza, l'Uro A è risultata un composto dai numerosi effetti benefici sulla funzione dei mitocondri; nel caso specifico degli studi presi in esame all'interno di questa ricerca bibliografica, i risultati registrati al termine dei trattamenti sperimentali sono sempre risultati più significativi rispetto a quelli dei gruppi di controllo.

Gli studi preclinici in *C.Elegans* hanno dimostrato che l'UroA induce la mitofagia, mantenendo un miglior controllo della qualità e della quantità mitocondriale, e prolunga la durata della vita. Nei ratti e nei topi l'UroA ha aumentato la funzionalità muscolare.

Gli studi in umano hanno dimostrato un miglioramento della mitofagia e della funzione mitocondriale nel muscolo scheletrico a seguito di somministrazione di Uro A. In particolare l'Uro A ha avuto un sorprendente impatto sulla forza muscolare delle gambe negli adulti di mezza età e ha portato ad un aumento della resistenza muscolare negli anziani.

La somministrazione di Uro A a livello molecolare ha dimostrato aumentare l'espressione genica mitocondriale relativa ai processi di biogenesi, mitofagia e ossidazione degli acidi grassi.

Il trattamento con Uro A riduce le acilcarnitine e ciò influisce positivamente sul processo di ossidazione degli acidi grassi migliorando la salute mitocondriale.

L'Uro A, agendo sull'attività mitocondriale, risulta quindi un approccio promettente per contrastare il declino muscolare correlato all'età.

Bibliografía

Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E, Aguilar CN (2008) Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 189–199. doi:10.1007/s00253-007-1276-2.

Aguilera-Gómez M, Cubadda F, Frenzel T, Heinonen M, Hirsch-Ernst K-I, Katrine Knutsen H, Mangelsdorf I, Neuhäuser-Berthold M, Poulsen M, Prieto Maradona M *et al* (2023) SCIENTIFIC PANEL ON NUTRITION, NOVEL FOODS AND FOOD ALLERGENS 145 th Working Group meeting on Novel Foods.

Alessandro Rubini (2010) Elementi di Fisiologia Umana.

Amazentis SA APPLICATION FOR THE APPROVAL OF UROLITHIN A AS A NOVEL FOOD INGREDIENT IN THE EUROPEAN UNION Pursuant to Regulation (EU) No 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 Concerning Novel Foods and Novel Food Ingredients NON-CONFIDENTIAL SUMMARY OF THE APPLICATION.

Andreux PA, Blanco-Bose W, Ryu D, Burdet F, Ibberson M, Aebischer P, Auwerx J, Singh A, Rinsch C (2019) The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab* 1: 595–603. doi:10.1038/s42255-019-0073-4.

Andreux PA, Van Diemen MPJ, Heezen MR, Auwerx J, Rinsch C, Jan Groeneveld G, Singh A (2018) Mitochondrial function is impaired in the skeletal muscle of pre-frail elderly. *Sci Rep* 8. doi:10.1038/s41598-018-26944-x.

Arata Y, Oshima T, Ikeda Y, Kimura H, Sako Y (2020) OP50, a bacterial strain conventionally used as food for laboratory maintenance of *C. elegans*, is a biofilm formation defective mutant.

Ares AM, Toribio L, García-Villalba R, Villalgordo JM, Althobaiti Y, Tomás-Barberán FA, Bernal J (2023) Separation of Isomeric Forms of Urolithin Glucuronides Using Supercritical Fluid Chromatography. *J Agric Food Chem* 71: 3033–3039. doi:10.1021/acs.jafc.2c07145.

Bakkalbaşı E, Menteş O, Artik N (2009) Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 283–298. doi:10.1080/10408390802064404.

Benz R, McLaughlin S (1983) The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophys J* 41: 381–398. doi:10.1016/S0006-3495(83)84449-X.

Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D (2010) The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int J Food Microbiol* 140: 175–182. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038.

Cardanho-Ramos C, Morais VA (2021) Mitochondrial Biogenesis in Neurons: How and Where. *Int J Mol Sci* 22: 13059. doi:10.3390/ijms222313059.

Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2003) Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem* 51: 3493–3501. doi:10.1021/jf020842c.

- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13: 1396–1402. doi:10.1038/sj.cdd.4401963.
- Cobley JN, Moulton PR, Burniston JG, Morton JP, Close GL (2015) Exercise improves mitochondrial and redox-regulated stress responses in the elderly: better late than never! *Biogerontology* 16: 249–264. doi:10.1007/s10522-014-9546-8.
- Coen PM, Jubrias SA, Distefano G, Amati F, Mackey DC, Glynn NW, Manini TM, Wohlgemuth SE, Leeuwenburgh C, Cummings SR *et al* (2013) Skeletal muscle mitochondrial energetics are associated with maximal aerobic capacity and walking speed in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68: 447–455. doi:10.1093/gerona/gls196.
- Coen PM, Musci R V., Hinkley JM, Miller BF (2019) Mitochondria as a Target for Mitigating Sarcopenia. *Front Physiol* 9. doi:10.3389/fphys.2018.01883.
- Cortés-Martín A, García-Villalba R, González-Sarrías A, Romo-Vaquero M, Loria-Kohen V, Ramírez-de-Molina A, Tomás-Barberán FA, Selma M V, Espín JC (2018) The gut microbiota urolithin metabolites revisited: the human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. *Food Funct* 9: 4100–4106. doi:10.1039/c8fo00956b.
- Dambrova M, Makrečka-Kuka M, Kuka J, Vilskersts R, Nordberg D, Attwood MM, Smesny S, Sen ZD, Guo AC, Oler E *et al* (2022) Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacol Rev* 74: 506–551. doi:10.1124/pharmrev.121.000408.
- David L. Nelson, Michael M. Cox (2015) *Introduzione alla biochimica di Lehninger*.
- Diaz F, Moraes CT (2008) Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 44: 24–35. doi:10.1016/j.ceca.2007.12.004.
- Distefano G, Goodpaster BH (2018) Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8: a029785. doi:10.1101/cshperspect.a029785.
- Drake JC, Yan Z (2017) Mitophagy in maintaining skeletal muscle mitochondrial proteostasis and metabolic health with ageing. *J Physiol* 595: 6391–6399. doi:10.1113/JP274337.
- Duchen MR (2004) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25: 365–451. doi:10.1016/j.mam.2004.03.001.
- Elliott AD (2020) Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom* 92: e68. doi:10.1002/cpcy.68.
- Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F (2013) Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1–15. doi:10.1155/2013/270418.
- Figueiredo PA, Mota MP, Appell HJ, Duarte JA (2008) The role of mitochondria in aging of skeletal muscle. *Biogerontology* 9: 67–84. doi:10.1007/s10522-007-9121-7.
- Frontera WR, Ochala J (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 96: 183–195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y.
- Gao A, Jiang J, Xie F, Chen L (2020) Bnip3 in mitophagy: Novel insights and potential therapeutic target for diseases of secondary mitochondrial dysfunction. *Clin Chim Acta* 506: 72–83. doi:10.1016/j.cca.2020.02.024.

- García-Villalba R, Giménez-Bastida JA, Cortés-Martín A, Ávila-Gálvez MÁ, Tomás-Barberán FA, Selma MV, Espín JC, González-Sarrías A (2022) Urolithins: a Comprehensive Update on their Metabolism, Bioactivity, and Associated Gut Microbiota. *Mol Nutr Food Res* 66: 2101019. doi:10.1002/mnfr.202101019.
- García-Villalba R, Beltrán D, Espín JC, Selma MV, Tomás-Barberán FA (2013) Time course production of urolithins from ellagic acid by human gut microbiota. *J Agric Food Chem* 61: 8797–8806. doi:10.1021/jf402498b.
- Gnoni A, Longo S, Gnoni G V, Giudetti AM (2020) Carnitine in Human Muscle Bioenergetics: Can Carnitine Supplementation Improve Physical Exercise? *Molecules* 25: 182. doi:10.3390/molecules25010182.
- Guo S, Liang Y, Murphy SF, Huang A, Shen H, Kelly DF, Sobrado P, Sheng Z (2015) A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. *Autophagy* 11: 560–572. doi:10.1080/15548627.2015.1017181.
- Guyton Arthur C., Midrio M. (2001) ELEMENTI DI FISIOLOGIA UMANA (Padova).
- Hahn MJ, Lovells H (2018) Gras Notice No.GRN 000791 Food and Drug Administration.
- Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, Kenyon C (2008) A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet* 4: e24. doi:10.1371/journal.pgen.0040024.
- Hasheminezhad SH, Boozari M, Iranshahi M, Yazarlu O, Sahebkar A, Hasanpour M, Iranshahy M (2022) A mechanistic insight into the biological activities of urolithins as gut microbial metabolites of ellagitannins. *Phytother Res* 36: 112–146. doi:10.1002/ptr.7290.
- Heilman J, Andreux P, Tran N, Rinsch C, Blanco-Bose W (2017) Safety assessment of Urolithin A, a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid. *Food Chem Toxicol* 108: 289–297. doi:10.1016/j.fct.2017.07.050.
- Holloszy JO, Kohrt WM, Hansen PA (1998) THE REGULATION OF CARBOHYDRATE AND FAT METABOLISM DURING AND AFTER EXERCISE.
- Hood DA, Memme JM, Oliveira AN, Triolo M (2019) The Annual Review of Physiology is online at. *Annual Review of Physiology Annu Rev Physiol* 81: 19–41. doi:10.1146/annurev-physiol-020518.
- Ishii T, Miyazawa M, Onouchi H, Yasuda K, Hartman PS, Ishii N (2013) Model animals for the study of oxidative stress from complex II. *Biochim Biophys Acta* 1827: 588–597. doi:10.1016/j.bbabi.2012.10.016.
- Jornayvaz FR, Shulman GI (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47: 69–84. doi:10.1042/bse0470069.
- Kujawska M, Jodynis-Liebert J (2020) Potential of the ellagic acid-derived gut microbiota metabolite - Urolithin A in gastrointestinal protection. *World J Gastroenterol* 26: 3170–3181. doi:10.3748/wjg.v26.i23.3170.
- Lee S-M, Lee SH, Jung Y, Lee Y, Yoon JH, Choi JY, Hwang CY, Son YH, Park SS, Hwang G-S *et al* (2020) FABP3-mediated membrane lipid saturation alters fluidity and induces ER stress in skeletal muscle with aging. *Nat Commun* 11: 5661. doi:10.1038/s41467-020-19501-6.
- Lipińska L, Klewicka E, Sójka M (2014) STRUCTURE, OCCURRENCE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ELLAGITANNINS: A GENERAL REVIEW *.

- Liu S, D'Amico D, Shankland E, Bhayana S, Garcia JM, Aebischer P, Rinsch C, Singh A, Marcinek DJ (2022) Effect of Urolithin A Supplementation on Muscle Endurance and Mitochondrial Health in Older Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 5: e2144279. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.44279.
- Longo N, Frigeni M, Pasquali M (2016) Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1863: 2422–2435. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.023.
- Malik AN, Czajka A (2013) Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* 13: 481–492. doi:10.1016/j.mito.2012.10.011.
- McCann MR, George De la Rosa MV, Rosania GR, Stringer KA (2021) L-Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine. *Metabolites* 11: 51. doi:10.3390/metabo11010051.
- McCormick R, Vasilaki A (2018) Age-related changes in skeletal muscle: changes to life-style as a therapy. *Biogerontology* 19: 519–536. doi:10.1007/s10522-018-9775-3.
- Memme JM, Erlich AT, Phukan G, Hood DA (2021) Exercise and mitochondrial health. *J Physiol* 599: 803–817. doi:10.1113/JP278853.
- Onishi M, Yamano K, Sato M, Matsuda N, Okamoto K (2021) Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J* 40: e104705. doi:10.15252/embj.2020104705.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131–24145. doi:10.1074/jbc.M702824200.
- Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG (2008) Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol* 46: 2728–2735. doi:10.1016/j.fct.2008.04.035.
- Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N (2019) Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 267–284. doi:10.1038/s41580-018-0092-0.
- Pickles S, Vigié P, Youle RJ (2018) Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol* 28: R170–R185. doi:10.1016/j.cub.2018.01.004.
- Popov L-D (2020) Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med* 24: 4892–4899. doi:10.1111/jcmm.15194.
- Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H (2016) Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med* 98: 56–67. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025.
- Quadrilatero J (2023) Mitochondria: Key modulators of skeletal muscle remodeling. *Semin Cell Dev Biol* 143: 1–2. doi:10.1016/j.semcdb.2022.10.004.
- Ramot D, Johnson BE, Berry TL, Carnell L, Goodman MB (2008) The Parallel Worm Tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. *PLoS One* 3: e2208. doi:10.1371/journal.pone.0002208.
- Ranallo RF, Rhodes EC, Buchanan JM (1998) Lipid Metabolism During Exercise.
- Ryu D, Mouchiroud L, Andreux PA, Katsyuba E, Moullan N, Nicolet-Dit-Félix AA, Williams EG, Jha P, Lo Sasso G, Huzard D *et al* (2016) Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat Med* 22: 879–888. doi:10.1038/nm.4132.

- Singh A, D'Amico D, Andreux PA, Fouassier AM, Blanco-Bose W, Evans M, Aebischer P, Auwerx J, Rinsch C (2022) Urolithin A improves muscle strength, exercise performance, and biomarkers of mitochondrial health in a randomized trial in middle-aged adults. *Cell Rep Med* 3: 100633. doi:10.1016/j.xcrm.2022.100633.
- Stroustrup N, Ulmschneider BE, Nash ZM, López-Moyado IF, Apfeld J, Fontana W (2013) The *Caenorhabditis elegans* Lifespan Machine. *Nat Methods* 10: 665–670. doi:10.1038/nmeth.2475.
- Taanman J-W (1998) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication.
- Talbot J, Maves L (2016) Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5: 518–534. doi:10.1002/wdev.230.
- Tantama M, Hung YP, Yellen G (2011) Imaging Intracellular pH in Live Cells with a Genetically Encoded Red Fluorescent Protein Sensor. *J Am Chem Soc* 133: 10034–10037. doi:10.1021/ja202902d.
- Tieland M, Trouwborst I, Clark BC (2018) Skeletal muscle performance and ageing. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9: 3–19. doi:10.1002/jcsm.12238.
- Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MA, Selma M V, García-Conesa MT, Espín JC (2017) Urolithins, the rescue of 'old' metabolites to understand a 'new' concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res* 61: 1500901. doi:10.1002/mnfr.201500901.
- Vanhauwaert A, Vanparys P, Kirsch-Volders M (2001) The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage.
- Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27: 201–206. doi:10.1152/advan.00025.2003.
- Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C (2010) Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol* 45: 138–148. doi:10.1016/j.exger.2009.11.002.
- Yan, Duanmu, Zeng, Liu, Song (2019) Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells* 8: 379. doi:10.3390/cells8040379.
- Yoon YG, Koob MD, Yoo YH (2010) Re-engineering the mitochondrial genomes in mammalian cells. *Anat Cell Biol* 43: 97. doi:10.5115/acb.2010.43.2.97.
- Zeiger E (2019) The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 841: 43–48. doi:10.1016/j.mrgentox.2019.05.007.